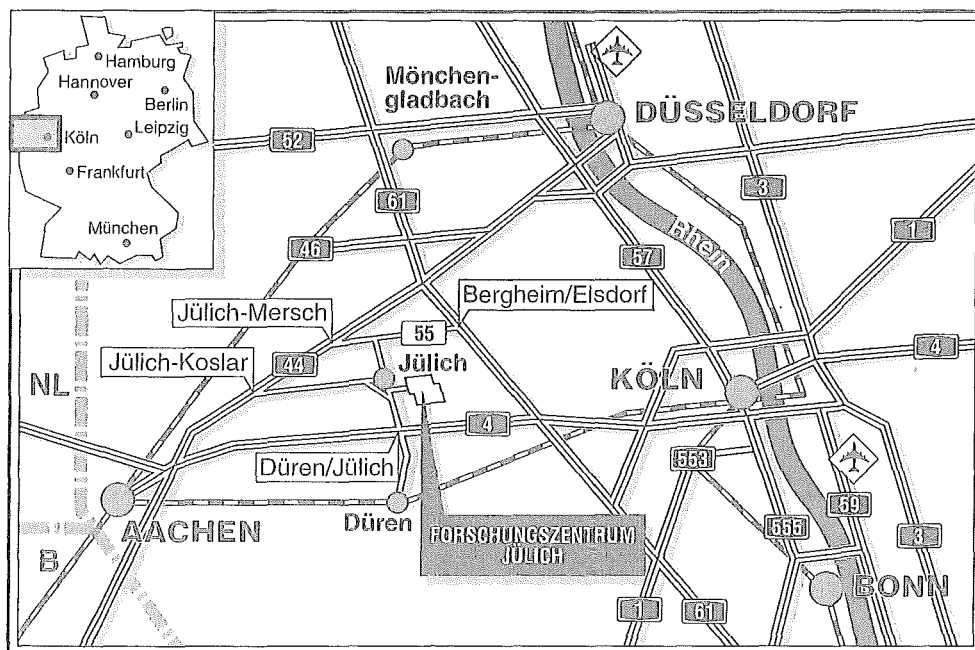


*Institut für Biotechnologie*

**Untersuchungen zur Limitierung  
des bakteriellen Proteinexports und  
Isolierung *prsA* - homologer Gene aus  
*Bacillus licheniformis* - Stämmen**

Elke Frings



**Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3101**

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3101

D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-61 02 · Telefax: 02461/61-61 03 · Telex: 833556-70 kfa d

**Untersuchungen zur Limitierung  
des bakteriellen Proteinexports und  
Isolierung *prsA* - homologer Gene aus  
*Bacillus licheniformis* - Stämmen**

Elke Frings



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Charakteristische Eigenschaften sekretorischer Proteine .....	1
1.2 Proteintranslokation in Gram - negativen Bakterien.....	4
1.3 Proteintranslokation in Gram - positiven Bakterien .....	9
1.4 Ziele der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Bakterienstämme und Phagen, Plasmide, Oligonukleotide.....	14
2.2 Chemikalien .....	17
2.3 Medien und Lösungen .....	17
2.4 Mikrobiologische Methoden .....	20
2.4.1 Stammhaltung.....	20
2.4.2 Transformation von Bakterien .....	21
2.4.3 Test auf Wachstumskomplementation konditional - letaler <i>sec</i> - Mutanten .....	22
Wachstumskomplementation des <i>Escherichia coli secA51<sup>ts</sup></i> Stammes MM52 .....	22
Wachstumskomplementation der <i>Escherichia coli</i> SecB - Null- mutante CK1953 .....	22
2.4.4 Isolierung eines OmpA - negativen <i>Escherichia coli</i> - Stammes .....	22
2.5 Proteinchemische Methoden .....	23
2.5.1 Probenaufarbeitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	23
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	23
2.5.3 "Western Blot" .....	24
2.5.4 Radioaktive Markierung von Zellproteinen und Immunfällung .....	25
2.5.5 Quantifizierung radioaktiver Markierung von Zellproteinen .....	26
2.6 DNA Techniken .....	26
2.6.1 Allgemeine gentechnische Methoden .....	26
DNA Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	26
Auffüllen überhängender 5'-DNA Enden .....	26
Dephosphorylierung von DNA.....	26
Ligationen.....	26
Agarose - Gelelektrophorese .....	27
Isolierung von DNA - Fragmenten .....	27
2.6.2 Synthese und Aufarbeitung spezifischer Oligonukleotide.....	27
2.6.3 Amplifikation von DNA - Fragmenten durch PCR.....	27
2.6.4 DNA Präparationen .....	28
Isolierung chromosomaler DNA.....	28
Minilysate zur Isolierung von Plasmid DNA .....	28
Plasmidisolierung im präparativen Maßstab .....	29
2.6.5 DNA - DNA ("Southern") - Hybridisierung .....	29
2.6.6 DNA - Sequenzierung .....	31
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Untersuchungen zum Proteinexport Gram - negativer Bakterien .....	33
3.1.1 Einfluß einer erhöhten SecA - Konzentration auf den Export des <i>Escherichia coli</i> Außenmembranproteins OmpA* .....	33

Konstruktion der Plasmide pEF3S1 und pEF3S3 zur induzierbaren Überproduktion der OmpA-Signalsequenzmutanten S1 und S3 (OmpA*), sowie Selektion eines OmpA-negativen <i>Escherichia coli</i> Stammes .....	33
Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecA - Protein und der Überexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	36
Einfluß einer erhöhten SecA - Konzentration auf den Export der OmpA* - Signalsequenzmutanten .....	38
3.1.2 Einfluß einer erhöhten SecB - Konzentration auf den Export des <i>Escherichia coli</i> Außenmembranproteins OmpA* .....	40
Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecB - Protein und Überexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	40
Einfluß einer erhöhten SecB - Konzentration auf den Export der OmpA - Signalsequenzmutanten .....	41
3.2 Untersuchungen zum Proteinexport Gram - positiver Bakterien .....	42
3.2.1 Einfluß der <i>Bacillus subtilis</i> SecA - Überexpression auf den Export der Lipase aus <i>Staphylococcus hyicus</i> .....	42
Induzierbare Expression der Lipase aus <i>Staphylococcus hyicus</i> .....	42
Konstruktion des Plasmids pWHsecA .....	43
Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecA - Protein und Überexpression in <i>Bacillus subtilis</i> .....	43
Nachweis der Überexpression des SecA - Proteins in <i>Bacillus subtilis</i> und Beeinflussung des Lipaseexportes .....	44
3.2.2 Einfluß der Expression des <i>Escherichia coli</i> SecB - Proteins auf den Export der Lipase in <i>Bacillus subtilis</i> .....	46
Konstruktion des Plasmids pWHsecB .....	47
Expression des heterologen <i>Escherichia coli</i> SecB - Proteins in <i>Bacillus subtilis</i> und Effekt auf den Lipaseexport .....	47
3.3 Isolierung <i>prsA</i> - homologer Gene aus <i>Bacillus licheniformis</i> .....	50
3.3.1 Hybridisierung chromosomaler DNA aus <i>Bacillus licheniformis</i> mit einer <i>prsA</i> - Gensonde aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	51
3.3.2 Klonierung und Sequenzierung eines <i>prsA</i> - homologen Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtyp DSM13 .....	51
3.3.3 Analyse der Sequenzdaten und Vergleich des <i>prsA</i> - homologen Gens aus <i>Bacillus licheniformis</i> mit dem <i>Bacillus subtilis prsA</i> - Gen .....	53
3.3.4 Klonierung und Sequenzierung eines <i>prsA</i> - homologen Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Subtilisinproduktionsstamm P300 .....	57
4. Diskussion .....	60
4.1 Einfluß einer erhöhten zellulären Konzentration der Exportkomponente SecA bzw. SecB auf die Proteinsekretion in <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> unter Überproduktionsbedingungen .....	60
4.1.1 Erhöhung der zellulären SecA - bzw. SecB - Proteinkonzentration in <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> .....	60
4.1.2 Einfluß einer erhöhten zellulären SecA - bzw. SecB - Konzentration auf den Proteinexport in <i>Escherichia coli</i> unter Überproduktionsbedingungen .....	62
4.1.3 Einfluß der erhöhten zellulären SecA - Konzentration bzw. der Expression des <i>Escherichia coli</i> - SecB auf den Proteinexport in <i>Bacillus subtilis</i> unter Überproduktionsbedingungen .....	64
4.2 Isolierung und Analyse der <i>prsA</i> - homologen Gene aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtypstamm DSM13 und dem Subtilisinproduktionsstamm P300 .....	65

4.2.1 Isolierung und Sequenzanalyse des <i>prsA</i> - Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtypstamm DSM13 .....	65
4.2.2 Analyse der Aminosäuresequenz des <i>Bacillus licheniformis</i> PrsA- Proteins und Vergleich mit dem <i>Bacillus subtilis</i> PrsA .....	66
4.2.3 Isolierung des <i>prsA</i> - Gens aus dem <i>Bacillus licheniformis</i> - Produktionsstamm P300 und Vergleich der Sequenz mit dem <i>prsA</i> - Gen von dem <i>Bacillus licheniformis</i> Wildtyp DSM13 .....	67
5. Zusammenfassung .....	69
6. Literatur .....	70





# 1. Einleitung

Durch die Kompartimentierung von Zellen können verschiedene und unterschiedlich regulierte Stoffwechselvorgänge gleichzeitig in einer Zelle ablaufen. Die Kompartimente stellen demnach funktionell unterschiedliche Reaktionsräume dar. Im Vergleich zu den eukaryontischen Zellen, die durch ihren komplexen Aufbau über zahlreiche Kompartimente wie u.a. Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien verfügen, liegt Bakterienzellen ein einfaches Bauprinzip zugrunde.

In den **Gram - negativen** Bakterien sind die innere und äußere Membran durch das Periplasma räumlich voneinander getrennt. Der periplasmatische Raum besteht aus einem einschichtigen, stark hydratisierten Peptidoglykangerüst, das über Lipoproteine mit der äußeren Membran verankert ist (Schlegel, 1985). Bei den **Gram - positiven** Bakterien wird die Cytoplasmamembran lediglich von einer vielschichtigen Zellwand umgeben, der Proteine, wie z.B. bei einigen *Bacillus* - Arten, als Bestandteile des sogenannten "S - layers" aufgelagert sein können.

Da die Cytoplasmamembran bei beiden Bakteriengruppen eine Permeabilitätsschranke für hydrophile Stoffe darstellt, wird die Molekül - und Ionenzusammensetzung der Zelle gezielt durch Proteine reguliert, welche in die Cytoplasmamembran eingelagert sind oder mit derselben assoziiert sind. Proteine der Cytoplasmamembran sind außerdem an dem Aufbau von Zellwandpolymeren, der Energiegewinnung, der Signalübertragung, sowie der Proteintranslokation beteiligt. Im Periplasma der Gram - negativen Bakterien befinden sich Proteine mit kataboler Funktion sowie Bindeproteine mit großer Affinität zu Nährstoffen. Sogenannte Porine bilden hydrophile Poren in der äußeren Membran der Gram - negativen Bakterien, die den Durchtritt von hydrophilen, niedermolekularen Substanzen ermöglichen.

Da alle Proteine im Cytoplasma synthetisiert werden, müssen die in der Zellhülle lokalisierten Proteine zu ihrem Bestimmungsort exportiert werden. Die meisten Membranproteine, die periplasmatischen Proteine der Gram - negativen Bakterien, sowie die meisten Zellwand - assoziierten oder in das Kulturmedium freigesetzten Proteine der Gram - positiven Bakterien werden über einen Weg exportiert, an dem die sogenannten Sec ("secretion") - Proteine als Exportkomponenten beteiligt sind.

## 1.1 Charakteristische Eigenschaften sekretorischer Proteine

Sekretorische Proteine werden in pro - und eukaryontischen Zellen als sog. Vorläuferproteine ("Precursor") mit einem aminoterminalen **Signalpeptid** synthetisiert. Das Signalpeptid ist ein wichtiges Merkmal, welches exportierte Proteine von cytoplasmatischen Proteinen unterscheidet. Die wichtigste Aufgabe des Signalpeptids ist die Einschleusung des Vorläufers in den Exportweg über die Wechselwirkungen mit der Membran und den Exportkomponenten. Durch das Signalpeptid wird weiterhin die Faltung des Vorläuferproteins verlangsamt, wodurch das Protein in einer für den Membrandurchtritt notwendigen, exportkompetenten Konformation gehalten wird. Das Signalpeptid wird während oder kurz nach der Membranpassage durch die

in der Cytoplasmamembran verankerten sog. Signalpeptidasen abgespalten, d.h. das Vorläuferprotein wird durch diese Membranproteine prozessiert. Obwohl alle Signalpeptide die gleiche Funktion ausüben, gibt es keine Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz, sondern einen konservierten strukturellen Aufbau (Abb. 1; von Heijne, 1985 u. 1990): Die aminoterminalen, hydrophile **n - Region** (2 bis 15 Aminosäuren Länge) besitzt durch eine oder mehrere positiv geladene Aminosäuren eine positive Nettoladung. Die Wechselwirkung dieser positiven Ladungen mit den negativ - geladenen Phospholipiden der Membran ist möglicherweise bei der Einlagerung des Signalpeptids in die Membran entscheidend (Kusters et al., 1991).

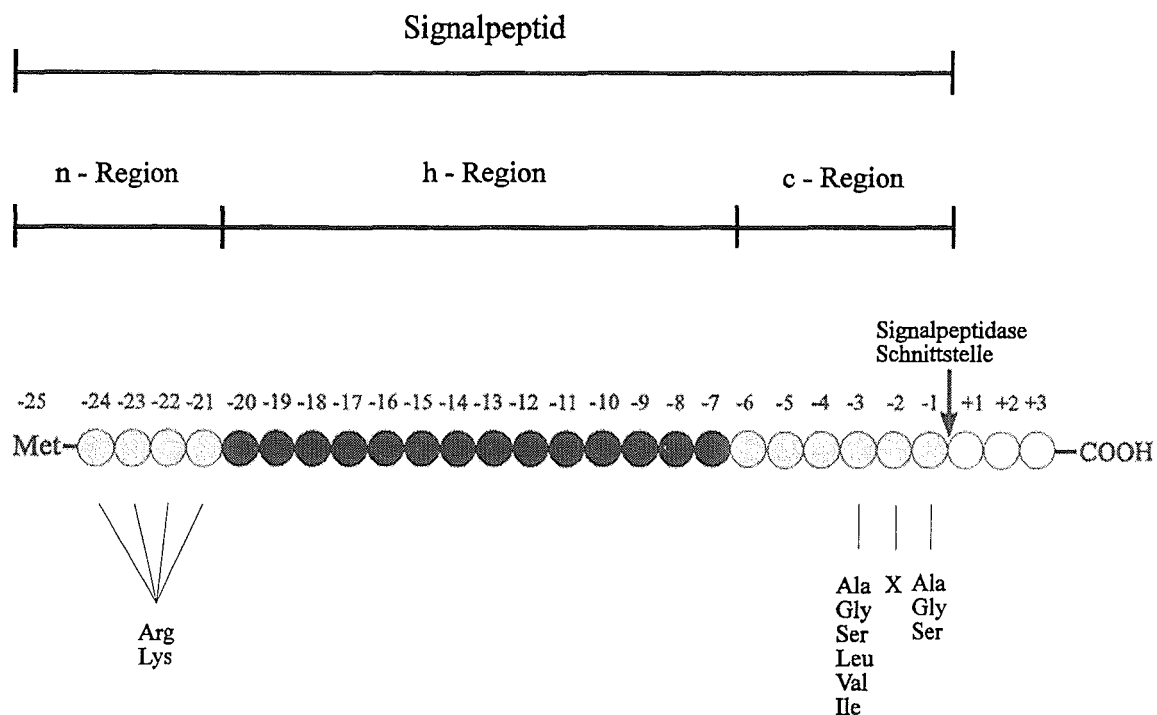


Abb. 1: Schematische Darstellung eines typischen bakteriellen Signalpeptids. Die Nummerierung der Aminosäuren im reifen Teil des Proteins und in dem Signalpeptid erfolgt ausgehend von der Signalpeptidase - Schnittstelle.

Der zentrale Bereich der Signalpeptide, die **h - Region** (Mindestlänge von 8 Aminosäuren), besteht aus einer ununterbrochenen Reihe von hydrophoben Aminosäuren. Stark polare oder geladene Aminosäuren fehlen in der h - Region, die durch den hohen Leucin - und Alaninanteil in apolarer Umgebung eine starke Tendenz zur Ausbildung einer  $\alpha$  - Helix hat. Die h - Region ist für die Einlagerung des Signalpeptids in die Membran verantwortlich. Sowohl durch das Entfernen basischer Aminosäuren in der n - Region, als auch durch das Verkürzen der h - Region oder durch das Einfügen stark polarer Aminosäuren in die h - Region wird die Exporteffizienz der Proteine drastisch reduziert. In der aus 5 bis 7 polaren Aminosäuren bestehenden

**c - Region** liegt die von der Signalpeptidase I erkannte Spaltstelle. Nach der -3/-1 - Regel finden sich an den Positionen -1 und -3 vor der Spaltstelle ausschließlich Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (von Heijne, 1983).

Die Signalpeptide der Lipoproteine sind gewöhnlich kürzer und besitzen mehr hydrophobe Aminosäuren in der h - Region als die Signalpeptide der Nichtlipoproteine (Hayashi u. Wu, 1990). Die Konsensus - Sequenz für die durch die Signalpeptidase II (Lipoprotein - Signalpeptidase) erkannte Spaltstelle lautet Leu-X-Y↓Cys, wobei an den Positionen -1 und -2 überwiegend die neutralen, kleinen Aminosäuren Alanin, Glycin oder Serin gefunden werden (Wu, 1987). Das Cystein an der Position +1 wird vor der Spaltung durch Anlagerung eines Diglycerids kovalent modifiziert (Hayashi u. Wu, 1990). Über die an dieses modifizierte Cystein kovalent gebundenen Fettsäuren werden die Lipoproteine später in der Ziellmembran verankert.

Wie bei den Gram - negativen Bakterien sind Signalpeptide Gram - positiver Bakterien aus einer n -, h - und c - Region aufgebaut. Mit einer durchschnittlichen Länge von 30 Aminosäuren sind die Signalpeptide der Gram - positiven Bakterien jedoch deutlich länger als die der Gram - negativen Organismen (durchschnittlich 24 Aminosäuren). Weiterhin ist die n - Region der Gram - positiven Bakterien oft höher positiv geladen als die entsprechende Region der Gram - negativen Signalpeptide (von Heijne u. Abrahmsen, 1989). Diese Unterschiede könnten in Spezies - spezifischen Unterschieden der Exportapparate beider Bakteriengruppen begründet sein. Grundsätzlich sind die Signale jedoch austauschbar: Mit Hilfe Gram - positiver Signalpeptide können Proteine in das Periplasma von Gram - negativen Bakterien exportiert werden (Sarvas, 1986). Umgekehrt können auch Proteine in Gram - positiven Bakterien durch Gram - negative Signalpeptide sekretiert werden (Meens et al., 1993).

Viele Exoproteine Gram - positiver Bakterien besitzen zusätzlich zum Signalpeptid noch ein sog. Propeptid, welches zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Proteinteil lokalisiert ist. Alle bekannten *Bacillus* - Exoproteasen werden beispielsweise als Präproenzyme mit **Propeptid** synthetisiert (Simonen u. Palva, 1993). Untersuchungen zur Funktion der Propeptide wurden hauptsächlich mit der alkalischen Serinprotease (Subtilisin) aus *Bacillus* bzw. der neutralen *Bacillus* - Protease durchgeführt. Die Deletion des Propeptids führt zur Sekretion von inaktivem Subtilisin in das Periplasma von *E.coli* (Ikemura et al., 1987). Das Propeptid ist demnach nicht zur Translokation notwendig. Wie auch durch "in vitro" Renaturierungsstudien bestätigt wurde, ist das Propeptid jedoch als "intramolekulares Chaperon" an der korrekten Faltung des Proteins in eine aktive Konformation beteiligt. Die Propeptide werden autokatalytisch oder durch die enzymatische Aktivität extrazellulärer Proteasen vor der Freisetzung der reifen Proteine in das Medium abgespalten (Power et al., 1986).

## 1.2 Proteintranslokation in Gram - negativen Bakterien

Exportproteine werden, wie bereits erwähnt, als Vorläuferproteine im Cytoplasma synthetisiert (Abb. 2). Damit diese Proteine über die Cytoplasmamembran exportiert werden können, müssen sie in einer locker gefalteten oder exportkompetenten Konformation vorliegen. Dies wird durch die Aktivität des Signalpeptids (s.o.), sowie durch die Wechselwirkung der Vorläufer mit sog. "molekularen Chaperonen" gewährleistet. "Molekulare Chaperone" beeinflussen die Faltung anderer Polypeptide oder ihre Anordnung in oligomeren Strukturen, ohne dabei selber Bestandteil der endgültigen Struktur zu sein (Ellis u. Hemmingsen, 1989). Das **SecB** - Protein ist das einzige bekannte exportspezifische Chaperon, welches signifikant ausschließlich mit Exportproteinen wechselwirkt und dadurch deren Faltung in eine exportinkompetente Konformation verlangsamt oder verhindert (Lecker et al., 1989; Kusters et al., 1989). Das 16 kDa große SecB - Protein bindet vermutlich als Homotetramer (Kumamoto u. Nault, 1989; Watanabe u. Blobel, 1989) an das Signalpeptid sowie den reifen Teil des Exportproteins (Altman et al., 1990; Gannon et al., 1989; Collier et al., 1988), wobei besonders  $\beta$  - Faltblattstrukturen für die Bindung von Bedeutung zu sein scheinen (MacIntyre et al., 1991).

Das SecB - Protein ist jedoch nicht generell für die Sekretion aller untersuchten Exportproteine notwendig. Je nach Exporteffizienz in *secB* - Mutanten wird zwischen SecB - abhängigen und SecB - unabhängigen Proteinen unterschieden. Das periplasmatische Maltosebindeprotein und die Außenmembranproteine OmpA und OmpF werden beispielsweise SecB - abhängig, das periplasmatische Ribosebindeprotein und die im Periplasma lokalisierte alkalische Phosphatase werden SecB - unabhängig exportiert (Kumamoto u. Beckwith, 1985; Kumamoto 1991). Der Befund, daß SecB - Nullmutanten zum langsamen Wachstum auf Minimalmedien befähigt sind, nicht aber zum schnellen Wachstum auf Vollmedium, zeigt daß das SecB - Protein unter bestimmten Bedingungen nicht essentiell ist (Kumamoto u. Beckwith, 1985). Dies kann dadurch erklärt werden, daß beim langsamen Zellwachstum pro Zeiteinheit weniger Proteine exportiert werden müssen als bei schnellem Wachstum. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß sog. Hitzeschockproteine die Funktion des SecB - Proteins z.T. übernehmen können. Werden Bakterienzellen Stressfaktoren wie z.B. hoher Temperatur ausgesetzt, wird eine sog. Hitzeschockantwort ausgelöst, wobei es u.a. zu einer Erhöhung der zellulären Konzentrationen der Hitzeschockproteine DnaK, DnaJ und GroEL/ES kommt. Diese Proteine sind ebenfalls "molekulare Chaperone", welche jedoch im Gegensatz zu dem SecB - Protein sowohl mit Exportproteinen (Lamiet et al., 1990) als auch mit cytoplasmatischen Proteinen wechselwirken (Marco et al., 1993). Die Hitzeschockproteine DnaK und DnaJ übernehmen z.T. SecB - Funktion, da SecB - Nullmutanten die Proteine DnaK und DnaJ sowohl zum Export verschiedener SecB - abhängiger Proteine, als auch zum Wachstum auf Minimalmedium benötigen. Weiterhin erhöht die Überproduktion der Proteine DnaK und DnaJ die Exportrate SecB - abhängiger Proteine in SecB - Nullmutanten und ermöglicht sogar das Wachstum dieser Mutanten auf Vollmedium (Wild et al., 1992).

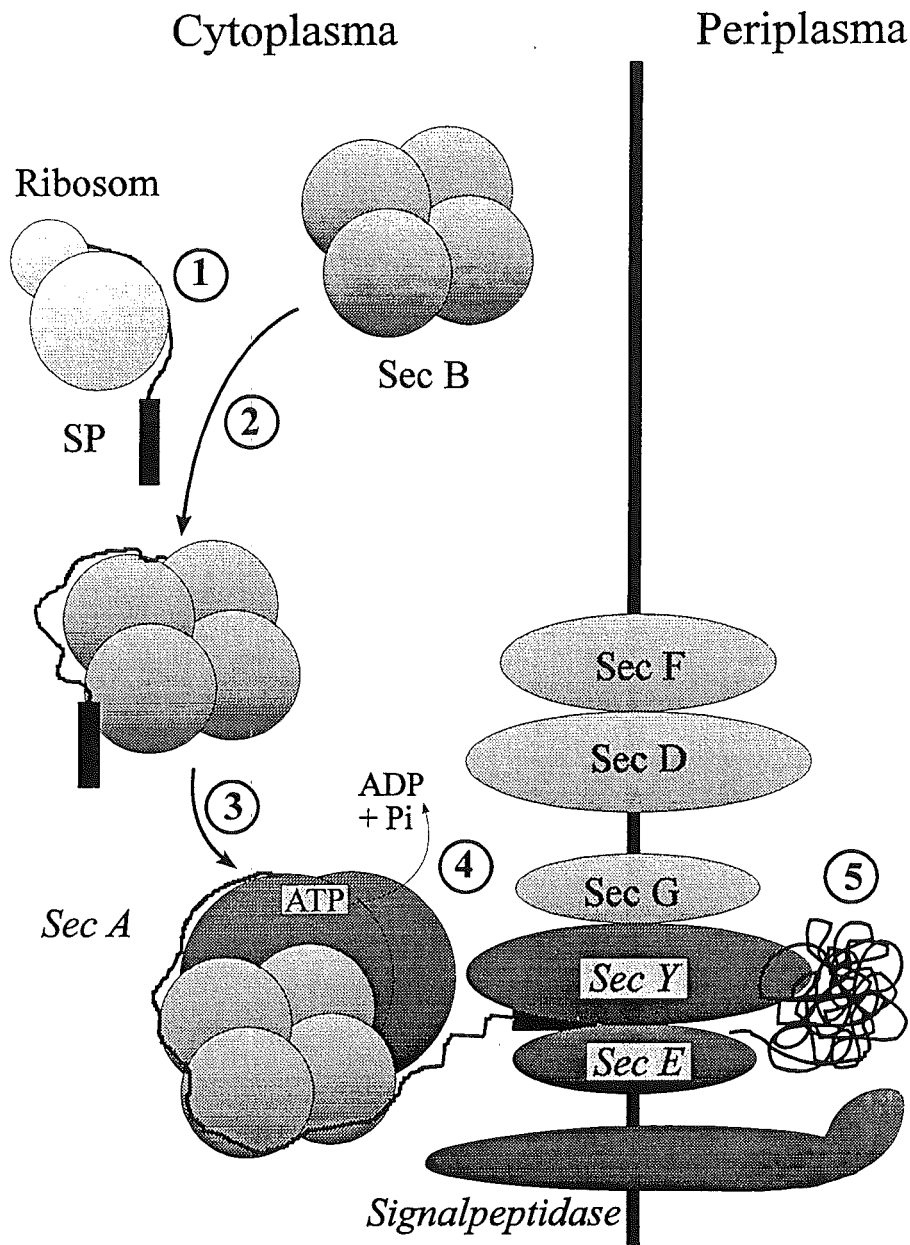


Abb. 2: Schematische Darstellung der Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran von *Escherichia coli*. Synthese eines sekretorischen Proteins mit aminoterminalen Signalpeptid (SP) im Cytoplasma (1), Bindung des Vorläuferproteins durch Chaperone wie das SecB - Protein (2) und Anlagerung an den Translokator-Komplex in der Membran mit dem SecA - Protein als peripherer Translokator-Komponente (3), Beginn der Translokation des Vorläufers nach ATP - Bindung und Hydrolyse am SecA - Protein (4). Nach dem mit der Abspaltung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase verbundenen Membrandurchtritts des Proteins erfolgt die Freisetzung des reifen sekretorischen Proteins (5) ins Periplasma. Homologe der durch dunkle Schattierung und Kursivdruck hervorgehobenen Exportkomponenten *SecA*, *SecE*, *SecY* und der *Signalpeptidase* wurden ebenfalls in Gram - positiven Bakterien identifiziert.

Neben seiner Funktion als Chaperon bewirkt das SecB - Protein auch die spezifische Heranführung des Vorläufers an den in der Cytoplasmamembran lokalisierten Translokatorkomplex. Der Komplex aus SecB und Vorläuferprotein besitzt eine hohe Affinität zu dem membranassoziierten SecA - Protein, welches als peripherer Bestandteil des Translokators den Rezeptor für diesen Komplex darstellt (Hartl et al., 1990). Das 102 kDa große **SecA** - Protein kommt sowohl frei im Cytoplasma als auch mit der Membranen assoziiert vor (Akita et al., 1991; Cabelli et al., 1991). Ein kleiner Teil des frei im Cytoplasma lokalisierten SecA - Proteins liegt vermutlich in einem labilen Komplex unbekannter Struktur von 500 - 1000 kDa vor (Driessen, 1993). Der überwiegende Teil des SecA - Proteins liegt sehr wahrscheinlich als Homodimer vor (Driessen, 1993). In dieser Form taucht das SecA - Protein während der Translokation tief in die Membran ein, was sehr wahrscheinlich durch die hierbei stattfindenden Wechselwirkungen des SecA - Proteins mit den Komponenten des integralen Translokators zum Eindringen des Vorläufers in die Membran führt (Ulbrandt et al., 1992).

Das SecA - Protein stellt durch die sog. Translokations - ATPase - Aktivität, welche die Bindung und Hydrolyse von ATP umfaßt, die Energie zur Verfügung, welche zur Einlagerung der ersten 20 Aminosäuren des Vorläuferproteins in die Membran und zur anschließenden Freisetzung des Vorläufers von dem SecA - Protein notwendig ist (Cunningham u. Wickner, 1989; Lill et al., 1990). Diese Translokations - ATPase - Aktivität des SecA - Proteins wird durch die Wechselwirkungen mit sauren Phospholipiden der Membran, dem SecY/SecE - Komplex als Bestandteil des Translokators und Vorläuferproteinen stimuliert (Lill et al., 1990). Nach erfolgter Initiation des Exportvorganges durch das SecA - Protein wird die weitere Proteintranslokation dann weitgehend durch das elektrochemische Membranpotential getrieben (Schiebel et al., 1991). Das SecA - Protein ist wegen der Bereitstellung der zur Translokation notwendigen Energie und seinen vielfältigen Wechselwirkungen (s.o.) die zentrale Komponente im Proteinexportapparat Gram - negativer Bakterien und schleust den Vorläufer in den Exportweg ein.

Das *secA* - Gen ist mit dem *GenX*, welches für ein exportiertes Protein unbekannter Funktion kodiert, und dem Mutatorgen *mutT* in einem Operon organisiert (Schmidt et al., 1991). Die Synthese des SecA - Proteins ist abhängig von der Transkription des stromaufwärts liegenden *GenX* (Schmidt et al., 1988). Die zelluläre SecA - Konzentration steigt um das 10 - 20 fache, wenn die durch Exportstreß ausgelöste Akkumulation von Vorläuferproteinen im Cytosol zu Störungen am Translokator führt (Gardel et al., 1987; Oliver u. Beckwith, 1982; Rollo u. Oliver 1988). Durch diese Störungen wird eine Dereprimierung der SecA - Synthese ausgelöst, die unter normalen Exportbedingungen durch die Bindung des SecA - Proteins an seine eigene mRNA z.T. reprimiert wird (Schmidt u. Oliver, 1989). Der intrazellulär akkumulierte Vorläufer könnte im Falle eines Exportblocks möglicherweise durch die Bereitstellung einer erhöhten SecA - Proteinmenge exportkompetent gehalten werden. Dies würde bedeuten, daß das SecA - Protein auch eine dem SecB - Protein vergleichbare Funktion als "molekulares Chaperon"

ausüben kann. Dafür spricht ebenfalls der Befund, daß der Proteinexport in einer SecB- Nullmutante durch die Duplikation eines *secA* - Genfragments teilweise wiederhergestellt werden kann (McFarland et al., 1993).

Das zu exportierende Vorläuferprotein wechselwirkt anschließend sequentiell mit dem SecE - und dem SecY - Protein (Bieker u. Silhavy, 1990), die als Membranproteine die zentralen Komponenten des integralen Translokatorkomplexes darstellen. Das 49 kDa große **SecY** - Protein durchspannt die Membran mit 10 Transmembrandomänen, wobei sowohl der Amino -, als auch der Carboxyterminus cytoplasmatisch lokalisiert sind (Akiyama u. Ito, 1987; Ito, 1992). Die Überexpression und die Stabilität des SecY - Proteins sind von der gleichzeitigen Überexpression des SecE - Proteins abhängig, was dafür spricht, daß beide Proteine in der Plasmamembran funktionell miteinander wechselwirken (Matsuyama et al., 1990).

Das 13,6 kDa große **SecE** - Protein besitzt drei Transmembrandomänen, wobei jedoch nur der dritte Transmembranbereich mit der davor liegenden cytoplasmatischen Domäne für die Proteinfunktion essentiell ist (Schatz et al., 1991).

Ein Membranprotein mit zwei oder drei vorhergesagten Transmembrandomänen (Nishiyama et al., 1993), das sog. **SecG** - Protein, ist mit den Translokatorkomponenten SecY und SecE fest assoziiert. Gereinigter SecY/SecE - Komplex enthält signifikante Mengen des SecG - Proteins und das SecG - Protein kann nur bei der gleichzeitigen Freisetzung des SecE - Proteins von diesem Komplex gelöst werden (Brundage et al., 1990). Die Kultivierung einer *secE*- Mutante, welche gegenüber dem Wildtyp verminderte Mengen des SecE - Proteins exprimiert, führt bei der nicht - permissiven Temperatur zu einer reduzierten SecY - und SecG - Proteinmenge, was ebenfalls auf eine Wechselwirkung des SecG - Proteins mit diesen beiden Sec - Proteinen hinweist. Das SecG - Protein wurde über einen biochemischen Ansatz als ein, die Proteintranslokation in Membranvesikel stimulierender, 12 kDa großer, hydrophober Faktor isoliert (Nishiyama et al., 1993). Dieser Befund, sowie die Tatsache, daß die Rekonstitution des SecY/SecE/SecG - Komplexes unter Zugabe von SecA und ATP eine effektive Proteintranslokation in Proteoliposomen erlaubt (Brundage et al., 1990 u. 1992) zeigen, daß das SecG - Protein einen weiteren Bestandteil des Translokatorkomplexes darstellt, welcher sehr wahrscheinlich als Proteintunnel die Membranpassage der Exportproteine ermöglicht (Simon u. Blobel, 1992; Joly u. Wickner, 1993).

Die Genprodukte der in einem gemeinsamen Operon organisierten Gene *secD* und *secF* sind als Transmembranproteine, mit je sechs die Membran durchspannenden Domänen, ebenfalls an der Proteintranslokation beteiligt: Kälte - sensitive *secD* - und *secF* - Mutanten verursachen Exportdefekte "in vivo" (Gardel et al., 1987 u. 1990) und führen dadurch zur Derepression der SecA - Synthese (Gardel et al., 1990; Rollo u. Oliver, 1988). Zu Sphäroplasten zugesetzte SecD - spezifische Antikörper blockieren die Freisetzung von exportierten Proteinen von der

Plasmamembran, was eine direkte Beteiligung des SecD - Proteins an der Sekretion sehr wahrscheinlich macht (Matsuyama et al., 1993). *SecD* - und *secF* - Nullmutanten weisen zwar einen deutlichen Sekretionsdefekt auf, sind aber unter bestimmten Bedingungen lebensfähig, d.h. daß die Proteine SecD und SecF zwar an der Proteinsekretion beteiligt, jedoch nicht absolut essentiell sind (Pogliano u. Beckwith, 1994). Beide Proteine besitzen große periplasmatische Domänen was vermuten läßt, daß zumindest ein Teil ihrer Funktion im Periplasma ausgeübt wird (Gardel et al., 1990). Mutationen im Signalpeptid eines sekretorischen Proteins, die den Export dieses Proteins blockieren, können durch Mutationen im *secA* - , im *secY* - bzw. im *secE* - Gen supprimiert werden. Diese Suppressormutationen ermöglichen wieder den Export der Proteine mit verändertem Signalpeptid was dafür spricht, daß die entsprechenden Exportkomponenten direkt mit dem Signalpeptid wechselwirken. In dem *secD* - bzw. dem *secF* - Gen wurden keine Signalsequenzmutanten - supprimierenden Mutationen gefunden (Stader et al., 1989), was ebenfalls für die Beteiligung der SecD - und SecF - Genprodukte an einem späten Schritt der Proteintranslokation spricht (Gardel et al., 1990).

Die **Signalpeptidase I** ist ein 37 kDa großes, integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen und einem periplasmatischen Carboxyterminus, der das aktive Zentrum zur Abspaltung der Signalpeptide während oder kurz nach der Translokation enthält (San Millan et al., 1989; Dalbey u. Wickner, 1987).

Signalpeptide der Lipoproteine werden durch die **Signalpeptidase II** (Lipoprotein - Signalpeptidase) abgespalten, bei welcher es sich um ein 18 kDa großes Membranprotein mit vier Transmembrandomänen handelt (Innis et al., 1984). Die abgespaltenen Signalpeptide werden durch spezifische, in der Plasmamembran und im Cytoplasma lokalisierte Signalpeptid - Peptidasen abgebaut (Ichihara et al., 1986; Novak et al., 1986).

Das eukaryontische Signalerkennungspartikel (SRP) ist ein multifunktionaler Protein - RNA - Komplex, der an Signalpeptide bindet und die weitere Translation der mRNA sekretorischer Proteine so lange verlangsamt, bis der Komplex an einen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet. Das Signalpeptid wird dann durch die Wechselwirkung des SRP mit diesem Rezeptor (Docking protein) freigesetzt und wechselwirkt mit der ER - Membran, wodurch gleichzeitig die Verzögerung der Translation aufgehoben wird und die Translokation initiiert wird (Pugsley, 1989). Da mittlerweile Homologe von zwei Komponenten des eukaryontischen SRP aus *Escherichia coli* isoliert wurden wird vermutet, daß ein Homologes des SRP möglicherweise auch am Proteinexport Gram - negativer Bakterien beteiligt ist. Zwischen dem 48 kDa großen *E.coli ffh* - **Genprodukt** und dem 54 kDa Protein des SRP, welches an der Signalsequenzerkennung beteiligt ist, wurde eine signifikante Sequenzhomologie gefunden (Byström et al., 1983). Das *E.coli ffs* - Gen kodiert für eine **4,5S RNA**, welche vermutlich ähnliche Faltungseigenschaften wie die 7S RNA des SRP besitzt (Poritz et al., 1988). "In vitro" Experimente zeigten, daß ein Komplex, bestehend aus dem 54 kDa Protein des SRP und der *E.coli* 4,5S RNA in einem eukaryontischen Proteintranslokationsansatz



z.T. funktionell ist (Poritz et al., 1990). Sequenzhomologie besteht weiterhin zwischen dem *E.coli ftsY* - **Genprodukt** und der  $\alpha$  - Untereinheit des SRP - Rezeptors in der ER - Membran (Gill et al., 1986). Möglicherweise stellen die *E.coli* 4,5S RNA und das Ffh - Protein sowie das FtsY - Protein Komponenten eines alternativen Sekretionsweges für SecB - unabhängig exportierte Proteine dar (Phillips u. Silhavy, 1992).

### 1.3 Proteintranslokation in Gram - positiven Bakterien

Gram - positive Bakterien besitzen im Gegensatz zu den Gram - negativen Bakterien nur eine Zellmembran und können Proteine direkt in das Kulturmedium sezernieren. Unter den Gram - positiven Bakterien zeichnen sich vor allem einige *Bacillus* - Arten dadurch aus, daß sie eine Reihe löslicher extrazellulärer Enzyme (Proteasen, Amylasen, Lipasen und Phosphatasen) in großer Menge sezernieren (Priest 1977 u. 1989). Durch die enzymatische Aktivität dieser Proteine werden komplexe Nahrungsquellen aufgeschlossen und nutzbar gemacht. Wegen der großen Sekretionskapazität (bis zu 12 g/l) und dem Fehlen toxischer Stoffwechselprodukte werden vor allem einige *Bacillus* - Arten zur industriellen Produktion homologer und heterologer Proteine eingesetzt. Zahlreiche prokaryontische Proteine wie Amylasen, alkalische und neutrale Proteasen (Priest, 1989), sowie eukaryontische Proteine wie das menschliche Interferon und das menschliche Interleukin - 3 werden im industriellen Maßstab mit *Bacillus* produziert (Simonen u. Palva, 1993). Trotz des erfolgreichen Einsatzes Gram - positiver Bakterien in der industriellen Produktion von manchen Exoproteinen führt jedoch eine starke Überexpression potentiell sekretierbarer Proteine zu einer Überlastung des Exportapparates und somit zu einer Verminderung der Ausbeute an sekretiertem Protein (Freudl, 1992; Sibakov et al., 1984, Ulmanen et al., 1985).

Die Identifizierung von Homologen der Sec - Proteine und von Bestandteilen des SRP - Komplexes in Gram - positiven Bakterien spricht dafür, daß zumindest einige Schritte im Proteinexport zwischen den Gram - negativen - und den Gram - positiven Bakterien konserviert sind. Trotz zahlreicher experimenteller Ansätze gelang es bislang noch nicht, ein Homologes des exportspezifischen *E.coli* Chaperons **SecB** in Gram - positiven Bakterien zu identifizieren. Hitzeschock - induzierte Chaperone wie DnaK, GroEL und GroES wurden hingegen sowohl aus *Bacillus* (Li u. Wong, 1992; Schmidt et al., 1992; Wetzstein et al., 1992), als auch aus weiteren Gram - positiven Bakterien (Lathigra et al., 1988; Narberhaus et al., 1992) isoliert. Das *div* - Gen von *Bacillus* wurde zunächst als Gen identifiziert, welches bei der Zellteilung die Bildung von Septen initiiert. Temperatur - sensitive *div* - Mutanten zeigen bei der nicht - permissiven Temperatur pleiotrope Defekte bei der Zellteilung, der Sporulation, der Autolyse, der Kompetenzentwicklung, sowie der Sekretion extrazellulärer Enzyme (Sadaie u. Kada, 1985; Sadaie et al., 1991). Die Sequenzierung des klonierten *div* - Gens zeigte, daß die abgeleitete Aminosäuresequenz zu 53% mit dem *E.coli* **SecA** - Protein identisch ist (Sadaie et al., 1991). Das *secA* - Gen aus *Bacillus subtilis* wurde ebenfalls durch die Hybridisierung chromosomaler

*Bacillus* - DNA mit einer *E.coli secA* - Gensonde identifiziert (Overhoff et al., 1991). Das Wachstum verschiedener Temperatur - sensibler *E.coli secA* - Mutanten wird unter bestimmten Bedingungen durch das *B.subtilis* SecA - Protein komplementiert. Weiterhin führt die Expression des *B.subtilis* SecA - Proteins in der *E.coli* Mutante BA13, welche bei der nicht - permissiven Temperatur kein SecA mehr synthetisiert, zur einer Verbesserung des proOmpA - Sekretionsdefekts (Klose et al., 1993). Das *B.subtilis* SecA - Protein kann demnach fehlendes oder nicht - funktionelles *E.coli* SecA bedingt ersetzen was darauf hinweist, daß die SecA - Proteine in dem jeweiligen Organismus ähnliche Funktionen übernehmen. Dazu gehört auch die Bereitstellung der zur Translokation notwendigen ATPase Aktivität. Eine ATP- Bindungsstelle konnte durch gerichtete Mutagenese im *B.subtilis* SecA - Protein lokalisiert werden (Klose et al., 1993). Weitere Übereinstimmungen mit dem *E.coli* SecA bestehen auch bezüglich der Affinität zu dem SecY/SecE - Komplex, Phospholipiden und Präprotein (van der Wolk et al., 1993). Die Transkription des *E.coli secA* - Gens erfolgt hauptsächlich durch den vor dem *GenX* gelegenen Promotor. Die Expression des *E.coli* SecA - Proteins unterliegt der Auto-regulation, an der der intergenische Bereich zwischen dem im Operon vorgeschalteten *GenX* und dem *secA* - Gen beteiligt ist. Da der vor dem *B.subtilis secA* - Gen identifizierte offene Leserahmen keine signifikante Homologie zu dem *GenX* aufweist und vor dem *B.subtilis secA*-Gen potentielle Promotorstrukturen gefunden wurden, unterliegt die SecA - Synthese in *B.subtilis* vermutlich keiner direkt vergleichbaren Regulation.

Mit dem *secA* - Gen aus *Staphylococcus carnosus* konnte ein weiteres Gram - positives *secA* - Homologes isoliert werden. Das *S.carnosus* SecA zeigt 60% Identität zu dem *B.subtilis* - und 46% Identität zu dem *E.coli* SecA - Protein. Diese Verteilung spiegelt sich in der heterologen Komplementation von *secA* - Mutanten wider: Das *S.carnosus* SecA kann das entsprechende Protein aus *B.subtilis*, nicht aber das SecA aus *E.coli* funktionell ersetzen. Die SecA - Proteine sind demnach zwischen den Gram - negativen und - positiven Bakterien nicht frei austauschbar (persönliche Mitteilung M. Klein, R. Freudl).

Durch die Sequenzanalyse des Spectinomycinoperons von *B.subtilis* wurde ein Homologes des *E.coli secY* - Gens identifiziert. Wie in *E.coli* liegt das *B.subtilis secY* - Gen unmittelbar hinter dem für das ribosomale Protein L15 kodierenden Gen (Suh et al., 1990). Gleichzeitig wurde das *B.subtilis secY* - Gen auch durch die Verwendung einer *E.coli secY* - Gensonde isoliert (Nakamura et al., 1990a). Das *B.subtilis* SecY - Protein weist eine 41%ige Homologie zu dem entsprechenden Protein von *E.coli* auf. Nach Strukturvoraussagen besitzen beide Proteine 10 Transmembrandomänen, 6 cytoplasmatische und 5 extracytoplasmatische Domänen. Starke Expression des *B.subtilis secY* - Gens führt im *E.coli* Wildtyp zu einer Beeinträchtigung des Wachstums. Andererseits wird der Exportdefekt des proOmpA - Proteins durch eine moderate Expression des *B.subtilis secY* - Gens komplementiert (Nakamura et al., 1990b). Trotz der strukturellen Übereinstimmungen kann das *B.subtilis* SecY jedoch den Wachstumsdefekt einer temperatursensitiven *E.coli secY* - Mutante nicht komplementieren.

Ausgehend von dem stark konservierten, für das ribosomale Protein L11 kodierenden Gen gelang es ein *secE* - Homologes sowohl aus *B.subtilis* (Jeong et al., 1993), als auch aus *S.carnosus* (Meens et al., 1994) zu isolieren. Die Gram - positiven SecE - Homologen sind deutlich kleiner als das *E.coli* SecE - Protein. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigte, daß die Gram - positiven SecE - Proteine starke Homologie zu dem für die Funktion essentiellen dritten Transmembranbereich und der unmittelbar davor lokalisierten cytoplasmatischen Domäne des *E.coli* SecE - Proteins aufweisen. Der Wachstumsdefekt sowie der Proteintranslokationsdefekt von Kälte - sensitiven *E.coli secE* - Mutanten wird durch die Gram - positiven SecE - Proteine komplementiert. Trotz der strukturellen Unterschiede können die Gram - positiven SecE - Proteine das *E.coli* SecE - Protein funktionell ersetzen.

Im Gegensatz zu *E.coli*, wo die Abspaltung der Signalpeptide durch eine essentielle **Signalpeptidase I** erfolgt, wurden in *B.subtilis* mittlerweile drei alternative Signalpeptidasen identifiziert (Wong u. Doi, 1986; van Dijl et al., 1992; van Dijl persönliche Mitteilung). Die Existenz einer Lipoprotein - Signalpeptidase konnte in *Bacillus* noch nicht nachgewiesen werden, sie wird aber aufgrund der in *Bacillus* "in vivo" und "in vitro" bestimmten Aktivität gefordert (Hayashi u. Wu, 1989). Aus dem Gram - positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* konnte eine **Signalpeptidase II** isoliert werden, welche die Signalpeptidase II von *E.coli* funktionell ersetzen kann, wie die Komplementation konditional - letaler *E.coli* Signalpeptidase II - Mutanten zeigte (Zhao u. Wu, 1992).

Durch die Isolierung von Homologen der 7S RNA und der SRP - 54 kDa - Untereinheit aus *B.subtilis* wurden Hinweise darauf erhalten, daß zumindest einige Proteine auch in Gram - positiven Bakterien bzw. *Bacillus* über einen alternativen SRP - Weg exportiert werden: Die Deletion des für eine **kleine, cytoplasmatische RNA** (scRNA) kodierenden Genorts führt zu Defekten in der Proteinsynthese. Durch die Expression der menschlichen 7SRNA oder der 4,5S RNA aus *E.coli* kann der Defekt aufgehoben werden was darauf hinweist, daß die scRNA aus *B.subtilis* ein Homologes der 7S RNA bzw. der 4,5S RNA darstellt (Nakamura et al., 1992). Durch die Verwendung einer *E.coli ffh* - Gensonde konnte ein **ffh - homologes Gen** aus *B.subtilis* isoliert werden. Die Deletion des *ffh* - Gens führt zur Letalität und beeinträchtigt die Translokation des  $\beta$  - Laktamase - und des  $\alpha$  - Amylasevorläufers (Honda et al., 1993).

Sowohl die Identifizierung der *secA* -, *secY* - und *secE* - Homologen, als auch die Isolierung Homologer der SRP - Bestandteile aus Gram - positiven Bakterien ist ein Hinweis darauf, daß zumindest frühe Schritte der Translokation zwischen beiden Bakteriengruppen konserviert sind. Möglicherweise unterscheiden sich jedoch die späten Exportschritte, da bisher keine *secD* - bzw. *secF* - homologen Gene aus Gram - positiven Bakterien isoliert werden konnten.

Zur Identifizierung weiterer zellulärer Exportkomponenten Gram - positiver Bakterien isolierten Kontinen u. Sarvas (1988) *Bacillus* - Mutanten, die pleiotrope Defekte in der Proteinsekretion aufweisen (*prs* - Mutanten). Es wurden zunächst Mutanten isoliert, die unter Überproduktionsbedingungen eine verminderte  $\alpha$  - Amylasesekretion zeigten. Durch die Charakterisierung chromosomaler Mutanten, in deren Kulturmedium die Konzentration der  $\alpha$  - Amylase und anderer Exoproteine gegenüber der im Wildtyp bestimmten Konzentration reduziert ist (Kontinen u. Sarvas, 1988), wurde das *prsA* - Gen identifiziert, welches für ein extracytoplasmatisches Lipoprotein kodiert (Kontinen et al., 1991). Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist eine signifikante Homologie zu dem **PrtM - Protein** aus *Lactococcus lactis* auf (Haandrikman et al., 1991; Vos et al., 1989). Das extrazelluläre Lipoprotein PrtM ist an der Reifung und Aktivierung der *Lactococcus* - Protease PrtP beteiligt. Wahrscheinlich aktiviert das PrtM - Protein die Proprotease PrtP zur autokatalytischen Abspaltung des Propeptids (Haandrikman et al., 1991; Vos et al., 1989). Bei dem PrtM - Protein handelt es sich somit vermutlich um ein extracytoplasmatisches Chaperon. Die vorausgesagte strukturelle Ähnlichkeit des *Lactococcus* PrtM - Protein mit dem *B.subtilis* PrsA - Protein ließ eine entsprechende Funktion des PrsA - Proteins an einem späten Schritt des Proteinexports in *B.subtilis* vermuten (Kontinen et al., 1991). Untersuchungen zum Export der  $\alpha$  - Amylase, des Subtilisins und von Subtilisin - Fusionsproteinen zeigten, daß in den *prsA* - Mutanten weder die Translokation bzw. Prozessierung noch die Freisetzung der Proteine ins Medium beeinflußt wird. Die in *prsA* - Mutanten exportierten Proteine unterliegen, wahrscheinlich wegen einer aberranten Faltung, einem schnelleren Proteinabbau. Vermutlich ist das PrsA - Protein als extracytoplasmatisches Chaperon an der korrekten Faltung der exportierten Proteine beteiligt (Jacobs et al., 1993).

Bei der Expression von chromosomal kodierter  $\alpha$  - Amylase ist die im Kulturmedium der *prsA* - Mutanten nachgewiesene Amylasemenge gegenüber der im Kulturüberstand des Wildtyps vorhandenen Amylase reduziert. Bei der Überproduktion der  $\alpha$  - Amylase ist der Anteil der im Kulturmedium der *prsA* - Mutanten nachweisbaren Amylase bezogen auf die gesamt synthetisierte Amylasemenge deutlich geringer, als bei der moderaten Expression chromosomal kodierter Amylase. Unter diesen Überproduktionsbedingungen ist außerdem die im Überstand der *prsA* - Mutanten vorhandene Proteaseaktivität gegenüber den Bedingungen einer moderaten Amylase - Expression deutlich reduziert (Kontinen u. Sarvas, 1988). Die Wechselwirkung der Exoproteine mit dem PrsA - Protein scheint daher gerade unter Überproduktionsbedingungen für eine korrekte Proteinfaltung und dadurch für die Stabilität der ins Kulturmedium sezernierten Proteine entscheidend zu sein.

#### 1.4 Ziele der Arbeit

Die Überproduktion sekretorischer Proteine führt zur intrazellulären Akkumulation von Vorläuferproteinen in *E.coli* und *B.subtilis* (Freudl, 1992). Die Sekretionskapazität der Zellen ist offensichtlich unter Überproduktionsbedingungen für den Proteinexport limitierend. Durch die gleichzeitige Überexpression der an dem limitierenden Schritt beteiligten Exportkomponenten könnte der Proteinexport möglicherweise verbessert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der Proteinexport in *E.coli* und *B.subtilis* unter Überproduktionsbedingungen durch die Konzentration der Proteine SecA bzw. SecB limitiert ist, d.h. ob die Proteinsekretion durch die Überexpression dieser Exportkomponenten verbessert werden kann.

Um einen Hinweis auf die Verbreitung des PrsA - Proteins in Gram - positiven Bakterien zu erhalten, sollte ein Homologes des *B.subtilis prsA* - Gens aus *Bacillus licheniformis* isoliert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine ein *prsA* - homologes Gen betreffende Mutation möglicherweise zu der erhöhten Produktivität des für die industrielle Subtilisinproduktion eingesetzten *B.licheniformis* - Stammes P300 beiträgt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Phagen, Plasmide, Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Phagen sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Bezeichnung der Genotypen entsprechen der von Bachmann (1990) bzw. Piggot et al., (1990), angegebenen Nomenklatur.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Phagen

Arten	Stämme	Genotypen	Referenzen
<i>Escherichia coli</i>	CK 1953	MC4100 <i>secB</i> :: Tn5	Kumamoto u. Beckwith, 1985
	MC1061	<i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara</i> - <i>leu</i> )7696, $\Delta$ ( <i>lac</i> )174, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>hsdR2</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>mcrB1</i> , <i>rpsL</i> ( <i>str</i> <sup>r</sup> )	Huynh et al., 1985
	MC4100	<i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>argF</i> - <i>lac</i> )U169, <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	Silhary et al., 1984
	JM109	<i>e14</i> -( <i>mcrA</i> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> - 1, <i>hsdR17</i> , ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lac</i> - <i>proAB</i> ), [ <i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math></i> M15]	Yanish - Perron et al., 1985
	XL1 - Blue MR	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> - 1, <i>recA</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , $\lambda$ -	Bullock et al., 1987
<i>Bacillus subtilis</i>	DB104	<i>his</i> , <i>nprR2</i> , <i>nprE18</i> , $\Delta$ <i>aprA3</i>	Kawamura u. Doi, 1984
	NIG1152	<i>met</i> , <i>his</i> , <i>div</i> - 341	Sadaie u. Kada, 1985
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM13	Wildtyp	Smith et al., 1964
	P300	Subtilisin - Überproduzent	Henkel KGaA
Phage	K3h1	OmpA - spezifisch	Morona et al., 1984

Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die zu den molekularbiologischen Arbeiten eingesetzten Plasmide:

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmide	Resistenzen	Derivate: Klonierte Gene	Referenzen
pBAD18	Amp <sup>R</sup>		Pogliano u. Beckwith, 1994
pBR322	Amp <sup>R</sup> /Tet <sup>R</sup>		Bolivar et al., 1977
pBR325	Cm <sup>R</sup> /Amp <sup>R</sup> / Tet <sup>R</sup>		Bolivar et al., 1977
pHSG576	Cm <sup>R</sup>		Takeshita et al., 1987
pJM10	Amp <sup>R</sup> /Tet <sup>R</sup>	Lipase aus <i>S. carnosus</i>	Meens et al., 1993
pLipPS1	Cm <sup>R</sup>	Lipase aus <i>S. carnosus</i>	Popp, 1986
pMF8	Amp <sup>R</sup>	pBR322: <i>GenX</i> , <i>secA</i> , <i>mutT</i> aus <i>E. coli</i>	Schmidt u. Oliver, 1989
pMKL4	Amp <sup>R</sup>	pUC19: <i>B. subtilis secA</i>	Klose et al., 1993
pRD87S1	Amp <sup>R</sup>	<i>ompA</i> - SS - MutanteS1	Freudl et al., 1988
pRD87S3	Amp <sup>R</sup>	<i>ompA</i> - SS - MutanteS3	Freudl et al., 1988
pRH407	Amp <sup>R</sup> /Cm <sup>R</sup>	pBR325: <i>gpsa</i> , <i>secB</i> aus <i>E. coli</i>	Clark et al., 1980
ptkt7bkm	Cm <sup>R</sup> /Kan <sup>R</sup>	<i>aph</i> des Transposons Tn903, <i>tkl</i>	zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Sprenger, G., Forschungszentrum Jülich, IBTI
pUC18/19	Amp <sup>R</sup>		Yanish - Perron et al., 1985
pWH1520	Amp <sup>R</sup> /Tet <sup>R</sup>		Rygus u. Hillen, 1991

Bei den in Tabelle 3 aufgelisteten Oligonukleotiden handelt es sich mit Ausnahme der universellen Sequenz - und Reverse - Sequenz Primer des M13/pUC - Systems um spezifische Oligonukleotide. Es wurden der Verwendungszweck der Oligonukleotide, eingefügte Schnittstellen bzw. Ribosomenbindungsstellen, sowie die Position und Herkunft der als Vorlage dienenden publizierten oder neu bestimmten Sequenzen angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Primer	5' - Sequenzen/Positionen	Verwendung, Referenzen
Sequenz	GTAAAACGACGGCCAGT 379 - 395	Sequenzierung, Yanish - Perron et al., 1985
Reverse - Sequenz	CAGGAAACAGCTATGAC 465 - 481	
WH1	GATAGTTGATGGATAAACTTGTTT keine Angaben möglich	Sequenzierung des Plasmids pWHsecB, Rygus u. Hillen, 1991
WH2	CAATTCATCGATATCTAGATCTCG keine Angaben möglich	
Ec1	ACCACTAGTCTAGACTGCAGAAGGAGGGT <i>SpeI</i> <i>XbaI</i> <i>PstI</i> <u>RBS</u> TTTCTACACA 27 - 41	<i>secB</i> aus <i>E.coli</i> , Amplifikation durch PCR, Kumamoto u. Nault, 1989
Ec2	AAACTGCAGGTACCTGATCATCAGGCATCC <i>PstI</i> <i>Asp718</i> TGATG 540 - 552	
Bs1	GGCTCTAGAGATGATAGAAGGAGCG <i>XbaI</i> <u>RBS</u> 516 - 537	<i>secA</i> aus <i>B.subtilis</i> , Amplifikation durch PCR, Sadaie et al., 1991
Bs2	TGTGGTACCCATTTCATTCACCTC <i>Asp718</i> 3123 - 3137	
Bs3	AATGAAGAAAATCGCAATAGCAGCTATC 62 - 89	<i>prsA</i> aus <i>B.subtilis</i> , Amplifikation durch PCR, Kontinen et al., 1991
Bs4	TTATTTAGAATTGCTTGAAGATGAAGAAG 913 - 941	



Bli1	CCCGAATTCTTTGACTAGACGGATGCC <i>EcoRI</i> 4 - 21	<i>prsA</i> aus <i>B.licheniformis</i> , Amplifikation durch PCR
Bli2	TTCTTTGTCGGAGACATCG 316 - 334	<i>prsA</i> aus <i>B.licheniformis</i> , Sequenzierung
Bli3	GGCTGTACCGTCAGTTGAAT 624 - 643	
Bli4	CTTGTCAAAGATGCTGATTT 887 - 906	
Bli5	CTGGTCGACTTGTTTTTTCA 927 - 946	
Bli6	GCGGAATTCCTTTGCATCGTCGGCATT <i>EcoRI</i> 1213 - 1231	<i>prsA</i> aus <i>B.licheniformis</i> , Amplifikation durch PCR und Sequenzierung

## 2.2 Chemikalien

Die verwendeten analysenreinen Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
- Sigma Chemical Company, St. Louis, USA (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Medienkomponenten und Fertigmedien stammten von Difco Laboratories, Detroit.

Biochemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von Boehringer Mannheim GmbH bezogen.

Radioaktives  $^{35}\text{S}$  - Methionin und  $[\alpha - ^{35}\text{S}]$  ATP wurden von Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig geliefert.

## 2.3 Medien und Lösungen

### LB (Luria Broth) - Medium

(Miller, 1972)

Trypton	10 g/l
Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l

### PH - Medium

(Liebl, 1986)

Pepton	10 g/l
Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Glukose	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l

Einstellen des pH - Wertes auf 7,2.

### M9 - Minimalmedium

(variiert nach Miller, 1972)

10 \* Salzlösung:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	60 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	10 g/l
NaCl	5 g/l

Nach dem Autoklavieren wurden für 1 l M9 -Medium folgende Substanzen gemischt:

10 * Salzlösung	100 ml
Glukose 50%	8 ml
CaCl <sub>2</sub> 50 mM	2 ml
Mg SO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 1 M	1 ml
ggf. Thiamin 50 mg/ml	1 ml

### ME - Minimaedium

(Vogel u. Bonner, 1956)

50 \* Salzlösung:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 g/l
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	175 g/l
Citronensäure * H <sub>2</sub> O	100 g/l
Mg SO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 g/l

mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

Für 1 l ME - Medium wurde eine C - Quelle zu einer Endkonzentration von 0,5% mit 20 ml

50 \* Salzlösung gemischt und mit H<sub>2</sub>O dest. aufgefüllt.

### SP - Medium zur Transformation von *B.subtilis*

(Hardy, 1985)

4 \* SP Medium:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	56 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	24 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8 g/l
Yeast Extract	4 g/l
Tri - Natrium - Citrat * 2 H <sub>2</sub> O	4 g/l

Mg SO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,8 g/l
Casamino Acids	0,8 g/l

Mit NaOH auf pH - 7,2 einstellen, 15 min autoklavieren.

#### SPI - Medium:

4 \* SP - Medium 1:4 mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnen, Glukose zu 0,5% (w/v) und die Aminosäuren zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugeben, für die der verwendete Stamm auxotroph ist.

#### SPII - Medium:

wie SPI - Medium, jedoch ohne Aminosäure - Supplementierung.

#### TE - Puffer

(Sambrook et al., 1989)

EDTA (Na <sub>2</sub> - Salz)	1 mM
Tris HCl pH 7,4	10 mM

#### TES - Puffer

(Sambrook et al., 1989)

NaCl	50 mM
EDTA (Na <sub>2</sub> - Salz)	1 mM
Tris HCl pH 8,0	10 mM

#### 10 \* TBE - Puffer

(Sambrook et al., 1989)

Tris	121 g/l
Borsäure	60 g/l
EDTA (Na <sub>2</sub> - Salz)	9,3 g/l

#### Lösungen für SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese

(Lämmli, 1970)

##### **SDS - Probenpuffer** (für 10 ml):

SDS 10% (w/v)	2,0 ml
Tris HCl pH 6,8 0,5 M	1,2 ml
Glycerin	1,0 ml
β - Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau 0,1%	0,2 ml
H <sub>2</sub> O dest.	5,1 ml

##### **1 \* Laufpuffer**

Glycin	190 mM
SDS	0,1% (w/v)
Tris HCl pH 6,8	25 mM

**10 \* Probenpuffer**

Glycerin	50% (w/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Xylencyanol	0,05% (w/v)

**10 \* TAE - Laufpuffer (für 5 l)**

Tris	242 g
Essigsäure 96%	57,2 ml
EDTA (Na <sub>2</sub> - Salz)	37,2 g

**2.4 Mikrobiologische Methoden**

Die Anzucht von *E.coli*, *B.subtilis* und *B.licheniformis* erfolgte in LB-Vollmedium bei 37°C. Zur Anzucht des *E.coli* - Stammes CK1953 (M9-Medium) und zur Kultivierung der zu "Pulse-chase" Experimenten eingesetzten *E.coli* - Stämmen (ME-Medium) wurden Minimalmedien verwendet.

Plasmid - oder Transposon - haltige *E.coli* - Stämme wurden unter Zugabe von 40 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin bzw. 30 µg/ml Chloramphenicol angezogen. Die Kultivierung rekombinanter *Bacillus*-Stämme erfolgte in Anwesenheit von 15 µg/ml Chloramphenicol bzw. 30 µg/ml Tetracyclin.

Die Expression von Genen unter der regulatorischen Kontrolle des lac-Promotors/Operators wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG, die Expression von Genen unter der Kontrolle des P<sub>N25</sub> - Promotor/lac-Operators durch 1,7 mM IPTG induziert. Durch den Zusatz von L - Arabinose in einer Endkonzentration von 0,2% wurde in *E.coli* die Expression von Genen induziert, welche einer Kontrolle durch das Arabinose - Operon unterliegen. Die Expression der Gene unter Kontrolle der regulatorischen Elemente des aus *Bacillus megaterium* stammenden Xylose - Operons wurden durch 0,5% Xylose induziert. Zur Repression der unter regulatorischer Kontrolle stehenden Gene wurden die Anzuchtmedien mit Glukose zu einer Endkonzentration von 0,5% versetzt. Vor Zusatz des jeweiligen Induktors wurden die in Glukose - haltigen Medien gewachsenen Zellen mit den entsprechenden Medien ohne Glukosezugabe gewaschen und in diesen resuspendiert.

**2.4.1 Stammhaltung**

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml Kultur mit 0,5ml 87%igem Glycerin gemischt und bei -70°C aufbewahrt.

## 2.4.2 Transformation von Bakterien

*E.coli*

(Cohen et al., 1972)

Eine Übernachtskultur wurde 1:100 in frisches LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4°C, 10 min, 5000 upm, Hereus Minifuge), das Pellet in 0,5 Volumen einer eiskalten, 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneutem Abzentrifugieren (s.o.) wurden die Zellen in 0,1 Volumen eiskalter, 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis gehalten. 0,5 - 1 µg DNA wurde zu 0,3 ml dieser kompetenten Zellen pipettiert. Der Transformationsansatz verblieb für weitere 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Es wurde 1 ml LB-Medium bzw. LB-Medium mit 0,5% Glukose zugegeben, der Ansatz zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz 60 min bei 37°C geschüttelt und auf Selektionsmedium ausplattiert.

*E.coli* CK1953

(variiert nach Miller, 1972)

Mit einer Übernachtskultur dieses Stammes wurde M9-Minimalmedium mit 0,5% Glukose und 50 µg/ml Kanamycin zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 20 min auf Eis gestellt und dann zentrifugiert (4°C, 10 min, 5000 upm, Hereus Minifuge). Die Zellen wurden mit 1 Volumen einer eiskalten, 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen, erneut abzentrifugiert (s.o.) und in 0,3 Volumen eiskalter, 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach weiteren 20 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (s.o.), in 1/15 Volumen eiskalter, 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, und der Ansatz für 60 min auf Eis gehalten. Zu 100 µl dieser Zellsuspension wurde 0,5 - 1 µg DNA gegeben. Nach weiteren 30 min auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 37°C für 90 sec durchgeführt. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 0,25 ml LB-Medium und 0,25 ml H<sub>2</sub>O dest. für 60 min bei 30°C kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (s.o.), mit 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung bei RT gewaschen und in 0,5 ml M9-Medium resuspendiert. Je 50 - 200 µl dieses Transformationsansatzes wurden ausplattiert.

*B.subtilis*

(Dubnau u. Davidoff-Abelson, 1971)

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 10 ml SPI-Medium mit einigen Kolonien des entsprechenden Bacillus - Stammes angeimpft und über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Vorkultur wurde mit 100 ml SPI-Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,2 verdünnt und unter starkem Schütteln (150upm) bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (10 min, 5000 upm, Hereus Minifuge). Das Zellpellet wurde in 10 ml des Kulturüberstandes resuspendiert, welcher mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 10% versetzt worden war. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots zu je 0,5 ml schockgefroren und bis zu sechs Wochen bei -70°C aufbewahrt. Die kompetenten Zellen wurden rasch bei 37°C aufgetaut und zu 0,5 - 2 µg der zu transformierenden DNA in einen 50 ml Kolben gegeben. Nach 60 minüti-

gem Schütteln (110 upm) bei 37°C wurden 5 ml Glukose-haltiges (0,5%) LB-Medium zugegeben und die Kultur für weitere 90 min bei 37°C unter starkem Schütteln (150 upm) inkubiert. Zur Selektion der Transformanten wurden je 200 µl des Ansatzes ausplattiert.

#### **2.4.3 Test auf Wachstumskomplementation konditional - letaler *sec* - Mutanten**

##### **Wachstumskomplementation des *E.coli secA51<sup>ts</sup>* Stammes MM52**

Der temperatursensitive Stamm MM52 wächst bei einer permissiven Temperatur von 30°C, bei der nicht - permissiven Temperatur von 42°C findet wegen der Synthese von nicht - funktionellem SecA (Austausch von Leucin 43 gegen Prolin) kein Wachstum mehr statt (Oliver und Beckwith, 1982; Schmidt et al., 1988). Der Stamm MM52 wurde mit dem pBR322 - Derivat pMF8 (*secA<sup>+</sup>*) bzw. gleichen Mikrogramm des Kontrollplasmids pBR322 bei 30°C transformiert (2.4.2). Aliquots dieser Ansätze wurden auf LB -Medium ausplattiert und über Nacht bei 30°C und 42°C inkubiert. Anhand der Koloniezahlen wurde das Wachstum der beiden Transformationsansätze bei den unterschiedlichen Temperaturen verglichen.

##### **Wachstumskomplementation der *E.coli SecB* - Nullmutante CK1953**

Die SecB - Nullmutante CK1953 (*secB* :: Tn5) ist nicht mehr zum Export SecB - abhängiger Proteine befähigt, wodurch dieser Stamm nicht mehr in Vollmedium wachsen kann. In Minimalmedium hingegen ist dieser Stamm wie der Wildtyp kultivierbar (Kumamoto u. Beckwith, 1985). Zum Nachweis von funktionellem, durch das Plasmid pRH407 exprimiertem SecB - Protein, wurden Versuche zur Wachstumskomplementation des mit diesem Vektor transformierten Stammes durchgeführt: Der Stamm CK1953 wurde nach der unter 2.4.2 beschriebenen Vorschrift mit gleichen DNA - Mengen des pBR325 - Derivates pRH407 (*secB<sup>+</sup>*) bzw. des Kontrollplasmids pRR325 transformiert. Aliquots der Transformationsansätze wurden sowohl auf LB - Platten, als auch zur Kontrolle auf M9 - Medium ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurde anhand der Koloniezahlen bestimmt, ob das Plasmid pRH407 im Gegensatz zu dem Kontrollvektor pBR325 das Wachstum auf LB - Medium komplementiert.

#### **2.4.4 Isolierung eines OmpA - negativen *E.coli* - Stammes**

100 µl einer Übernachtskultur des *E.coli* - Stammes MC1061 wurden mit 100 µl Lysat (Titer 10<sup>11</sup>/ml) des OmpA - spezifischen Phagen K3h1 gemischt und 20 min bei 37°C präabsorbiert. Aliquots dieses Ansatzes wurden auf LB - Medium ausplattiert und die Platten über Nacht bei ebenfalls 37°C inkubiert. Phagenresistente Kolonien wurden isoliert und zur Herstellung von Zellextrakten (2.5.1) in Flüssigmedium kultiviert. Durch SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (2.5.2) und "Western Blot" (2.5.3) mit OmpA - Antiserum wurden diese Kolonien bezüglich ihrer OmpA - Expression kontrolliert. Kolonien wurden dann als OmpA - negative Stämme verwendet, wenn kein OmpA - Antigen in den Zellextrakten nachgewiesen werden konnte.

## 2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.5.1 Probenaufarbeitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gesamtzellextrakt von *E.coli* (Lämmli, 1970)

2 ml der jeweiligen Kultur wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 upm, Eppendorf Zentrifuge), das Pellet in 400 µl SDS - Probenpuffer aufgenommen und die Zellen durch 10 minütige Inkubation bei 95°C aufgeschlossen.

Gesamtzellextrakt von *B.subtilis* (Le Grice et al., 1986)

Das Zellpellet aus 2 ml Kultur wurde in 200 µl einer Lösung aus 50 mM Tris HCl pH 7,2, 15% Saccharose aufgenommen. Nach Zugabe von 40 µl einer Lösung aus 0,25 mM Tris HCl pH 7,2, 5 mg/ml Lysozym wurde die Probe für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 360 µl Lämmli-Probenpuffer zugemischt und für 10 min bei 95°C hitzedenaturiert.

Aufarbeitung der Kulturüberstände (Bensadoun u. Weinstein, 1976)

Zur Konzentrierung der Kulturüberstände von *B.subtilis* wurde eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure durchgeführt: 1 ml Kulturüberstand wurde mit 50 µl einer 0,3%igen (w/v) Natrium - Desoxycholat - Lösung gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Trichloressigsäure wurde zu einer Endkonzentration von 10% zugesetzt und der Ansatz 30 min auf Eis gestellt. Die gefällten Proteine wurden durch 15 minütige Zentrifugation (4°C, 15000 upm, Eppendorf Zentrifuge) pelletiert. Der Niederschlag wurde 2 - 3 mal mit Aceton gewaschen, getrocknet, in 100 µl SDS - Probenpuffer gelöst und 10 min bei 95°C hitzedenaturiert.

### 2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte gemäß ihres Molekulargewichtes in 10%igen bzw. 17%igen SDS - Polyacrylamidgelen (Sambrook et al., 1989).

#### a) Trenngel

Lösungen	10%	17%
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	10 ml	17 ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml
10% SDS	0,3 ml	0,3 ml
60% (v/v) Glycerin	4,7 ml	4,7 ml
10% Ammoniumperoxidisulfat	0,3 ml	0,3 ml
H <sub>2</sub> O dest.	7,2 ml	0,2 ml

## b) Sammelgel

Lösungen	5%
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	5 ml
0,5 M Tris HCl pH 6,8	7,5 ml
10% SDS	0,3 ml
10% Ammoniumperoxidisulfat	0,3 ml
H <sub>2</sub> O dest.	16,9 ml

Die Polymerisation der Gele wurde jeweils durch Zugabe von 20 µl TEMED gestartet. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine wurden neben den denaturierten Proben auch Proteinlängenstandards gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 10 - 15 mA in 1\*Laufpuffer (2.3). Die Gele wurden entweder zur Proteinfärbung 45 min mit Coomassie Blue - Lösung behandelt, mit 30% (v/v) Methanol/ 10% (v/v) Eisessig entfärbt und getrocknet, oder die Gele wurden für den spezifischen Nachweis von Proteinen mit Antikörpern auf Nitrozellulose geblottet (s.u.).

### 2.5.3 "Western Blot"

(Towbin et al., 1979)

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch die Behandlung der durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern. Dazu wurden die Proteine in der Semi - Dry - Blotting Apparatur (Pharmacia - LKB) unter Verwendung des vom Hersteller angegebenen diskontinuierlichen Puffersystems 1,5 Stunden bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> von der Gelmatrix auf Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, BA 85) übertragen. Nach dem Transfer wurden freie Bindungsstellen der Membran durch eine einstündige Inkubation bei 37°C in Lösung I (3% RSA, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 0,9% NaCl) abgesättigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in Lösung II (0,3% RSA, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20). Der 1. Antikörper aus Kaninchen wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben und der Ansatz entweder 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch zweimaliges Waschen (30 min) mit Lösung II wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Ein mit Peroxidase gekoppelter 2. Antikörper aus Ziegen (Hawkes et al., 1982) ermöglicht über die Bindung an die konstante Domäne des Kaninchen - Immunglobulins die spezifische Detektion von Proteinen. Dieser 2. Antikörper wurde ebenfalls in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben und die Membran für eine weitere Stunde geschüttelt. Anschließend wurde das Filter zweimal mit Lösung II gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte durch die Peroxidaseaktivität des 2. Immunglobulins nach Zusatz von Lösung III (60 mg  $\alpha$  - Chloronaphtol, 20 ml Ethanol, 80 ml H<sub>2</sub>O, 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Reaktion wurde durch Abspülen der Membran mit Wasser und anschließendes Trocknen gestoppt.



#### 2.5.4 Radioaktive Markierung von Zellproteinen und Immunfällung

Zur Bestimmung der Exportkinetik einzelner sekretorischer Proteine wurden "Pulse - chase" Experimente mit  $^{35}\text{S}$  - Methionin nach den Angaben von Gebert et al., 1988 und Nilsson et al., 1993 durchgeführt. Die rekombinanten *E.coli* - Stämme MC 1061 wurden über Nacht in ME-Medium mit 0,5% Glycerin und allen Aminosäuren außer Methionin (je 50  $\mu\text{g/ml}$ ) in Gegenwart der entsprechenden Antibiotika bei 37°C kultiviert. Diese Übernachtskulturen wurden mit frischem Medium zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,03 verdünnt und bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 - 0,3 bei 30°C geschüttelt. Die Expression der unter der Kontrolle des Arabinose - Regulators stehenden *ompA* - Gene wurden dann durch Zugabe von Arabinose zu einer Endkonzentration von 0,2% induziert. Die Kulturen wurden für 5 min, 10 min, 15 min, oder 2 h 15 min bei 30°C induziert. Zur Einstellung identischer optischer Dichten wurden die Kulturen abzentrifugiert und in ME-Medium (s.o.) resuspendiert. 1,8 ml Kultur wurden durch Zugabe von 50  $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$  - Methionin bei 30°C markiert ("pulse"). Nach einer bzw. zwei Minuten wurde der Einbau radioaktiven Methionins durch Zusatz von 105  $\mu\text{l}$  "chase"- Lösung (100  $\mu\text{l}$  nicht - radioaktives Methionin 20 mg/ml, 5  $\mu\text{l}$  Chloramphenicol 40 mg/ml) gestoppt. Proben von je 400  $\mu\text{l}$  markierter Kultur wurden unmittelbar nach Zugabe der "chase"-Lösung und zu den angegebenen "chase"- Zeiten in 200  $\mu\text{l}$  eiskaltes 40%ige Trichloressigsäure pipettiert. Die Proben wurden zur Proteinfällung über Nacht bei 4°C gehalten. Nach dem Zentrifugieren der Ansätze (4°C, 10 min, 15000 upm, Eppendorf Zentrifuge) wurde das Pellet zweimal mit Aceton gewaschen, getrocknet, in 60  $\mu\text{l}$  Lysepuffer I (2% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 8,0) aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Lysepuffer II (0,15% NaCl, 0,1 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 2% Triton X - 100) zugemischt und die Proben 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der die gelösten Proteine enthaltende Überstand wurde zur Präzipitation der OmpA- bzw. SecA - Proteine mit 8  $\mu\text{l}$  Anitserum versetzt und bei 30°C für 90 min geschüttelt. Zur Fällung des Antigen - Antikörper Komplexes wurden 80  $\mu\text{l}$  von *Staphylococcus aureus* Zellen (Pansorbin 10% (w/v), Calbiochem) zugegeben, die nach Herstellerangaben vorbehandelt worden waren. Die Suspension wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20°C, 5 min, 13000 upm, Eppendorf Zentrifuge) wurden die Pansorbinzellen nacheinander mit den Puffern I, II und III gewaschen:

##### Waschpuffer I:

1% Triton X - 100

1 M NaCl

50 mM Tris HCl pH 8,0

##### Waschpuffer II:

0,1% SDS

0,5 M LiCl

50 mM Tris HCl pH 7,5

##### Waschpuffer III:

50 mM Tris HCl pH 7,5

Das Pellet wurde in 40 µl SDS - Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C hitzedenaturiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 upm, Eppendorf Zentrifuge) wurden die Proteine des Überstandes durch SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (2.5.2) getrennt. Die Gele wurden anschließend für 30 min fixiert (45% Methanol, 10% Eisessig), 60 min in dem Fluorographiereagenz EN<sup>3</sup>HANCE<sup>TM</sup> (NEN Research Products, Du Pont) geschwenkt und zur Präzipitation für 30 min in Wasser geschüttelt. Die Gele wurden getrocknet und zur Fluorographie über Nacht bei -70°C auf Röntgenfilm (X-Ray, Fuji) exponiert.

### **2.5.5 Quantifizierung radioaktiver Markierung von Zellproteinen**

Zur Quantifizierung der radioaktiven Markierung bestimmter Zellproteine wurden die "counts per minute" (cpm) der mit <sup>35</sup>S - Methionin markierten Proteine in dem Scintillationszähler Tricarb Modell 1600 CA der Firma Canberra Packard bestimmt. Dazu wurden die markierten Proteinbanden nach Immunfällung und SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (2.5.2) aus dem getrockneten Gel herausgeschnitten und in einem Scintillationsgefäß mit 40 µl dest. Wasser versetzt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden 4 ml Fluorosol (National Diagnostics) zugegeben und die Gefäße vor der Messung über Nacht bei 50°C inkubiert.

## **2.6 DNA Techniken**

### **2.6.1 Allgemeine gentechnische Methoden**

#### **DNA Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Die DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen wurde nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim GmbH) durchgeführt und die DNA Spaltprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) kontrolliert.

#### **Auffüllen überhängender 5'-DNA Enden**

Überhängende 5'-Enden wurden durch die Polymeraseaktivität des Klenow - Fragments (Boehringer Mannheim GmbH) der DNA Polymerase I aus *E.coli* nach Sambrook et al., 1989 aufgefüllt.

#### **Dephosphorylierung von DNA**

Die Abspaltung von 5' endständigen Phosphatgruppen erfolgte durch die enzymatische Aktivität der hitzeinaktivierbaren Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) von der Boehringer Mannheim GmbH nach Herstellerangaben.

#### **Ligationen**

Zur Ligation mit der T4 -DNA -Ligase (Boehringer Mannheim GmbH) wurden Vektor und Insert in molaren Verhältnissen von 1:2 bis 1:5 in einem Volumen von 15 µl eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer (66mM Tris

HCl pH 7,5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTE, 1 mM ATP) nach Zugabe von 1,5 Einheiten T4 - DNA - Ligase.

### **Agarose - Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA - Fragmenten erfolgte durch Agarose - Gelelektrophorese in TAE - Puffer nach den Angaben von Sambrook et al., 1989. Je nach der Größe der aufgetrennten Fragmente wurden 0.8 - 2%ige Agarose - Gele verwendet. Zur Bestimmung der Konzentration und/oder der Größe der Fragmente wurden neben den in 10\*Probenpuffer aufgenommenen DNA - Proben auch DNA - Längenstandards gelelektrophoretisch getrennt. Die DNA wurde in 1%iger Ethidiumbromid - Lösung angefärbt.

### **Isolierung von DNA - Fragmenten**

Nach der Behandlung der DNA mit spaltenden und modifizierenden Enzymen, anschließender Gelelektrophorese und Färbung wurden die zu isolierenden DNA - Banden aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wurde unter Verwendung des "GeneClean"-Kits (Dianova GmbH, Hamburg) aus der Gelmatrix herausgelöst und gereinigt.

## **2.6.2 Synthese und Aufarbeitung spezifischer Oligonukleotide**

Die zur Sequenzierung und Polymerase - Ketten - Reaktion (PCR) verwendeten spezifischen Oligonukleotide wurden mit dem DNA - Synthesizer der Firma Applied Biosystems (Modell 380) nach der Phosphoramid Methode (Caruthers et al., 1987) auf einer Säule synthetisiert. Die spezifischen Oligonukleotide wurden durch 1 ml 25%iges Ammoniak von der Säule eluiert. Durch Inkubation des Eluats bei 60°C wurden die Schutzgruppen über Nacht abgespalten. Die Ammoniak - Lösung wurde in der Vakuumzentrifuge bis zu einem Restvolumen von maximal 20 µl verdampft. Nach Zugabe von 300 µl 0,3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2 Volumen Ethanol wurden die Oligonukleotide über Nacht bei -20°C gefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (4°C, 120 min, 15000 upm, Eppendorf Zentrifuge), das Pellet mit 70%igem und 100%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE - Puffer aufgenommen. Reinheit und Konzentration der Oligonukleotide wurde durch UV - Absorptionsmessung bei 260 nm/ 280 nm und Agarose - Gelelektrophorese bestimmt.

## **2.6.3 Amplifikation von DNA - Fragmenten durch PCR**

Die Amplifikation des zwischen zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primern) gelegenen Templates erfolgte in einem PCR Gerät der Firma Perkin Elmer Cetus. Bestandteile des Reaktionsansatzes waren:

- 10 µl 10\*Puffer (100 mM Tris HCl pH 8,3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1 mg/ml Gelatine)
- 20 µl dNTP - Mix (je 1,25 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- je 0,5 µg der verwendeten Oligonukleotide (Primer)

- 1 ng des zu amplifizierenden DNA - Bereiches (Template)
- 2,5 Einheiten Taq - Polymerase (Boehringer Mannheim GmbH)

Der Reaktionsansatz wurde mit H<sub>2</sub>O dest. auf 100 µl aufgefüllt und mit Öl überschichtet. Die PCR umfaßte 30 Syntheszyklen nach folgenden Vorgaben:

- Denaturierung der Template - DNA bei 92°C für 2 min
- Annealing der Primer an die denaturierte DNA bei 55°C für 1 min
- Synthese der komplementären DNA durch die Taq - DNA - Polymerase bei 72°C für 3 min

Zur Aufarbeitung der PCR - Produkte wurde zunächst das Öl der PCR - Ansätze abgezogen. Verbliebene Öl - Reste wurden durch Extraktion mit 200 µl Chloroform entfernt. Die Proben wurden anschließend mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Zur Fällung der DNA - Produkte wurden 100 µl 4 M Ammoniumacetat und 200 µl Isopropanol zugesetzt und der Ansatz nach 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (20°C, 25 min, 15000 upm, Eppendorf Zentrifuge). Das DNA - Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE - Puffer aufgenommen.

## 2.6.4 DNA Präparationen

### Isolierung chromosomaler DNA

Die chromosomale DNA des *E.coli* - Stammes JM109, des *B.subtilis* - Stammes DB104 sowie der *B.licheniformis* - Stämme DSM13 und P300 wurden nach Kaiser u. Murray, 1979 für DNA - DNA - Hybridisierungsexperimente (2.6.6) isoliert:

Die Stämme wurden über Nacht in 100 ml LB - Medium kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4°C, 10 min, 8000 upm, JA10 - Rotor, Beckmann), mit eiskaltem TES - Puffer gewaschen und in 2 ml 25% Saccharose, 50 mM Tris HCl pH 8,0 resuspendiert. Es wurde 1 ml Lysozym - Lösung (10 mg/ml) zugesetzt und die Zellsuspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,8 ml 0,25 M EDTA pH 8,0 wurden die Zellen 15 min auf Eis gestellt. Der Zellaufschluß erfolgte nach Zumischen von 2 ml Triton - Lysis - Mix (2% Triton X - 100, 60 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 8,0) in Gegenwart von Pronase (100 µg/ml) für 3 Stunden bei 37°C. Das Lysat wurde mehrmals mit Phenol/Chloroform (1:1) und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die chromosomale DNA wurde aus der wäßrigen Phase nach Zugabe von 0,25 Volumen 2 M LiCl<sub>2</sub> und Überschichten mit 2 Volumen Ethanol (-20°C) gefällt. Die DNA wurde anschließend mit einem Glasstab aufgewickelt und nach Trocknen in 200 µl TE - Puffer gelöst.

### Minilysate zur Isolierung von Plasmid DNA

Die Präparation von Minilysaten erfolgte nach einer variierten Methode von Birnboim u. Doly, 1979, sowie Ish - Horowitz u. Burke, 1981.

### *E.coli*

Die Zellen aus 2 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und in 100 µl Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat pH 4,8) zugesetzt und nach weiteren 5 min auf Eis das ausgefällte Protein und die chromosomale DNA 1 min abzentrifugiert, mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die DNA anschließend mit 2 Volumen Ethanol (-20°C) 2 min bei Raumtemperatur gefällt. Der Niederschlag wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl TE - Puffer gelöst.

### *B.subtilis*

Die Zellen aus 10 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 wurden abzentrifugiert (4°C, 10 min, 5000 upm, Hereus Minifuge), in 200 µl Lösung I (s.o.) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml für 15 min auf Eis gehalten. Es wurden 400 µl Lösung II (s.o.) zugemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 300 µl der Lösung III (s.o.) zugegeben und der Ansatz erneut 5 min auf Eis gestellt. Die weitere Behandlung wurde, wie bereits für *E.coli* beschrieben, durchgeführt.

### **Plasmidisolierung im präparativen Maßstab**

Plasmide mit niedriger Kopienzahl, wie z.B. pBR322 - Derivate (15 - 20 Kopien/Zelle) wurden aus 500 ml Kultur, Plasmide mit hoher Kopienzahl (z.B. pUC - Derivate, 500 - 700 Kopien/Zelle) aus 150 ml Kultur der *E.coli* - Stämme JM109 oder XL1 - Blue MR isoliert. Die Aufarbeitung dieser Kulturen erfolgte mit dem Quiagen Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben (Diagen GmbH, Hilden).

### **2.6.5 DNA - DNA ("Southern") - Hybridisierung**

Die DNA - DNA - Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin - markierten DNA - Sonden zur Identifizierung und Isolierung homologer Gene durchgeführt.

#### DNA Transfer

(variiert nach Southern, 1975)

Zur "Southern" - Hybridisierung wurde entweder durch Restriktionsenzyme gespaltene Plasmid - DNA oder geschnittene chromosomale DNA durch Agarose - Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Transfer auf Nylonmembran (Nytran N13, Schleicher und Schuell) erfolgte in einer Vakuum - Blot - Apparatur (Pharmacia - LKB): Die aufgetrennte DNA wurde durch Überschichten des Agarose - Gels mit 0,25 M HCl depuriniert, mit einer Lösung aus 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH denaturiert und anschließend mit einer Lösung aus 2,0 M NaCl, 1 M Tris HCl pH 5,0 neutralisiert. Der weitere Transfer erfolgte für 1 Stunde in 20\* SSC - Puffer (3,0 M

NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0). Die einzelsträngige DNA wurde durch UV - Bestrahlung (UV - Crosslinker, Firma Stratagene) auf der Membran fixiert.

### Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde nach dem Protokoll des "Nonradioactive DNA labeling and detection" - Kit der Boehringer Mannheim GmbH durchgeführt:

Um die unspezifische Bindung der Sonde an die Nylonmembran zu verhindern, wurde die Membran für 1 Stunde bei 68°C in Prähybridisierungslösung (s.u.) mit 15% bzw. bis 30% Formamid geschwenkt. Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung gegen frische Hybridisierungslösung (s.u.) derselben Formamidkonzentration ersetzt. Die Digoxigenin - markierte Sonde wurde durch PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) und chromosomaler DNA als Vorlage nach den unter 2.6.3 beschriebenen Vorgaben durchgeführt. Abweichend von diesem Protokoll wurden dem Reaktionsansatz 10 µl eines Nukleotidmixes aus je 1,25 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP und 0,25 mM Digoxigenin - 11 -dUTP zugesetzt. Die Digoxigenin - markierte Sonde wurde unmittelbar vor der Hybridisierung durch 10 minütiges Erhitzen bei 95°C und Abkühlen auf Eis denaturiert. Nach Zugabe der Sonde wurde die Nylonmembran in der Hybridisierungslösung über Nacht bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung der DNA - Sonde wurde die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 2 \* SSC, 0,1% SDS und anschließend zweimal für 15 min bei 68°C mit einer Lösung aus 0,1 \* SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt: Die Membran wurde 1 min in Lösung I (s.u.) inkubiert, 30 min in Puffer II (s.u.) geschwenkt und erneut kurz mit Lösung I gewaschen. Das an alkalische Phosphatase gekoppelte Anti - Digoxigenin - Konjugat wurde 1:5000 in Puffer I verdünnt und die Membran in dieser Lösung für 30 min inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit Lösung I wurde ungebundenes Antikörper - Konjugat entfernt. Die Membran wurde 2 min in Puffer III (s.u.) äquilibriert und mit Lösung IV (s.u., 10 ml/100 cm<sup>2</sup> Membran) in Plastikfolie eingeschweißt und zur Farbentwicklung im Dunkeln gehalten. Diese Farbreaktion wurde durch Inkubation in Lösung V gestoppt und die Membran abschließend getrocknet.

### **Prähybridisierungs- und**

### **Hybridisierungslösung:**

5 \* SSC  
0,1% (w/v) N-laurylsarcosinat  
0,02% (w/v) SDS  
5% (w/v) Blocking Reagenz  
15% bis 30% Formamid

### **Lösung I:**

150 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 7,5

### **Lösung II:**

0,5% (w/v) Blocking Reagenz in Lösung I

### **Lösung III:**

100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>,  
100 mM Tris HCl pH 9,5

**Lösung IV:**

45 µl NBT - Lösung (75 mg/ml 4-Nitroblau -  
Tetrazolium - Chlorid),  
35 µl X - Phosphat - Lösung (50 mg/ml  
5 -Brom - 4 - Chlor - 3 - Indolyl -  
Phosphat),  
10 ml Lösung III

**Lösung V:**

1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8,0

**2.6.6 DNA - Sequenzierung**

Sowohl Plasmid - DNA, als auch PCR - Produkte wurden nach der von Sanger et al., 1977 entwickelten Didesoxynukleotid - Terminationsmethode sequenziert. Dazu wurden die Puffer und Nukleotide des "Sequenase Version 2.0 DNA - Sequencing" - Kit (United States Biochemicals, Cleveland, Ohio) verwendet. Die Sequenzierung umfaßte die alkalische Denaturierung doppelsträngiger DNA, die Markierung mit  $^{35}\text{S}$  ATP, die Verlängerung der markierten Ketten und die Trennung der DNA - Ketten durch Polyacrylamid - Gelelektrophorese.

Alkalische Denaturierung

Etwa 1 µg DNA in einem maximalen Volumen von 8 µl wurde nach Zugabe von 40 µl einer Lösung aus 0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA 30 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl Neutralisierungspuffer (2 M Ammoniumacetat pH 4,5) und 100 µl Ethanol (-20°C) gleichzeitig zu dem Ansatz pipettiert und die denaturierte DNA für 20 min bei -70°C gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (4°C, 10 min, 15000 upm, Eppendorf Zentrifuge), mit 70%igem Ethanol gewaschen und innerhalb von 90 sec in einer vorgeheizten Vakuum-zentrifuge getrocknet.

Annealing der Primer

Zu der getrockneten DNA wurden 2 µl 5 \* Reaktionspuffer (250 mM NaCl, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM Tris HCl pH 7,5), zur Plasmid - Sequenzierung 2,5 ng Primer, zur Sequenzierung der PCR - Produkte 50 ng Primer zugesetzt. Der Annealing - Ansatz wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. auf 10 µl aufgefüllt. Die Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA erfolgte für 30 min bei 37°C.

Sequenzreaktionen

Zur Markierung der DNA mit [ $^{35}\text{S}$ ] - ATP wurden zu dem Annealingansatz folgende Komponenten zugesetzt:

0,1 M DTT	1,0 µl
Labeling Mix (dCTP, dGTP, dTTP je 7,5 µm; 1:15 mit $\text{H}_2\text{O}$ dest. verdünnt)	2,0 µl
[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ] dATP (>600 Ci/mmol)	1,0 µl

Die Markierung wurde durch Zugabe von 2 µl der 1:8 in Puffer ( 5 mM DTT, 0,5 mg/ml RSA, 10 mM Tris HCl pH 7,5) verdünnten Sequenase Version 2.0 gestartet und für 4 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Überführen von je 3,5 µl des Reaktionsansatzes zu 2,5 µl des auf 37°C vorgewärmten, basenspezifischen Terminationsmixes (z.B. ddA - Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 80 µM, ddATP 8 µM, 50 mM NaCl) erfolgte der DNA -Kettenabbruch für 4 min bei 37°C. Die Terminationsreaktion wurde durch Zugabe von 4 µl eines Puffers aus 20 mM EDTA, 95% Formamid, 0,05% Bromphenol Blau, 0,05% Xylen Cyanol FF gestoppt. Unmittelbar vor Trennung der DNA - Fragmente durch Polyacrylamid - Gelelektrophorese wurden die Proben 2 min bei 95°C erhitzt.

#### Denaturierende Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die DNA - Ketten wurden in einem 6%igen Polyacrylamid - Gel unter denaturierenden Bedingungen ( 8 M Harnstoff) getrennt. 100 ml der Gel - Polymerisationslösung enthielten:

Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	20,0 ml
Harnstoff	42,0 g
10 * TBE - Puffer	10.0 ml
10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat	0,4 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ca. 40 ml

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 100 µl TEMED gestartet und das Gel unverzüglich gegossen. Das Gel wurde vor dem Auftragen von je 3 µl der Reaktionsansätze durch einen etwa halbstündigen Vorlauf auf etwa 50°C temperiert. Die Auftrennung erfolgte bei 2500 V, 55 mA und 150 W in 1 \* TBE - Puffer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Fixierung 30 min in 10%ige Essigsäure gelegt und anschließend zur Entfernung des Harnstoffes 10 min unter fließendem Wasser abgespült. Das Gel wurde bei 80°C getrocknet und zur Autoradiographie auf einem Kodak Bio Max MR - Film (Interga Biosciences, Fernwald) exponiert.



### 3. Ergebnisse

Die Überproduktion eines sekretorischen Proteins wie z.B. des OmpA - Proteins führt in *E.coli* zur Überlastung des zellulären Exportapparates und somit zur Vorläuferakkumulation im Cytosol (Freudl, 1992). Nicht exportierter Vorläufer faltet dabei in eine exportinkompetente Konformation und kann daher nicht mehr exportiert werden. Die Sekretionskapazität kann unter Überproduktionsbedingungen durch die Verfügbarkeit von cytoplasmatischen Exportkomponenten bzw. Bestandteilen des Translokator Komplexes oder durch die Verfügbarkeit von Exportkomponenten, welche an der Freisetzung des Proteins von der Cytoplasmamembran beteiligt sind, begrenzt sein. Denkbar wäre, daß ein größerer Anteil des sekretorischen Proteins möglicherweise durch die Bereitstellung einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten cytoplasmatischen Chaperonkonzentration exportkompetent gehalten werden könnte, wodurch mehr Vorläufer dieses Proteins zur Translokation zur Verfügung steht.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Proteinexport in Gram - negativen bzw. in Gram - positiven Bakterien unter Überproduktionsbedingungen durch die Proteine SecA bzw. SecB limitiert ist. Dazu wurde der Einfluß einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten SecA - bzw. SecB - Konzentration auf den Export eines Modellproteins bestimmt. Um die gleichzeitige Überexpression des *secA* - bzw. *secB* - Gens und des für das Exportprotein kodierenden Gens zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Bakterienstämme mit jeweils zwei Plasmiden transformiert. Das eine Plasmid trug das für die Exportkomponente kodierende Gen, das zweite Plasmid das Gen für das sekretorische Protein.

#### 3.1 Untersuchungen zum Proteinexport Gram - negativer Bakterien

##### 3.1.1 Einfluß einer erhöhten SecA - Konzentration auf den Export des *E.coli* Außenmembranproteins OmpA\*

In dem Gram - negativen Bakterium *E.coli* sollte die zelluläre SecA - Konzentration durch das Einführen einer Plasmid - kodierten Kopie des *secA* - Gens erhöht werden, so daß neben chromosomal - kodiertem SecA zusätzlich Plasmid - kodiertes SecA - Protein synthetisiert wird. Mit dem Plasmid pMF8 (Schmidt u. Oliver, 1989) stand ein Derivat des Vektors pBR322 zur Verfügung, auf welchem das *GenX*, das *secA* - Gen und ein Teil des *mutT* - Gens als Bestandteile des *E.coli secA* - Operons vorliegen.

##### Konstruktion der Plasmide pEF3S1 und pEF3S3 zur induzierbaren Überproduktion der OmpA-Signalsequenzmutanten S1 und S3 (OmpA\*), sowie Selektion eines OmpA-negativen *E.coli* Stammes

Um den Einfluß einer erhöhten zellulären SecA - Konzentration auf den Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen zu bestimmen wurden Bedingungen gewählt, unter denen die Synthese des zu untersuchenden Modellproteins zu einer deutlichen Vorläuferakkumulation

führte. Die Signalsequenzmutanten OmpA - S1 und - S3 des *E.coli* Außenmembranproteins OmpA (Abb. 3), im weiteren als OmpA\* bezeichnet, sind durch eine verkürzte hydrophobe Region und das Einfügen positiver Ladungen am Aminoterminus des Signalpeptids charakterisiert.



Abb. 3: **Signalpeptide des OmpA - Wildtypproteins und der Signalsequenzmutanten OmpA - S1 bzw. -S3**

Die unterstrichenen Aminosäuren bilden die hydrophobe Region der Signalpeptide. Die in den Signalsequenzmutanten OmpA -S1 und - S3 eingefügten Aminosäuren sind hervorgehoben.

Dadurch werden diese Signalsequenzmutanten im Gegensatz zu dem gemischt co - (60%) und posttranslational exportiertem *E.coli* Wildtyp - Außenmembranprotein OmpA ausschließlich posttranslational exportiert. Die Transkription dieser Proteine durch starke Promotoren, wie z.B. den *lac* - Promotor, führt zu einer wesentlich stärkeren Vorläuferakkumulation als die entsprechende Expression des Wildtyp - Proteins. (Freudl et al., 1988). Die für diese Mutanten - Proteine kodierenden Gene standen auf den Vektoren pRD87S1 und - S3 zur Verfügung (Freudl et al., 1988). Diese Plasmide konnten hier jedoch nicht direkt verwendet werden, da die gleichzeitige selektive Replikation mit dem Plasmid pMF8 (*secA*) wegen der durch beide Plasmide vermittelten Ampicillinresistenz nicht möglich ist. Es wurden daher die Plasmide pEF3S1 und pEF3S3 (Abb. 4) konstruiert, welche durch das *aph* - Gen Kanamycinresistenz vermitteln, und auf denen zur Vermeidung letaler Effekte die Expression der *ompA* -S1 bzw. -S3 Gene reprimierbar bzw. zur Einstellung von Überproduktionsbedingungen induzierbar ist: Das *E.coli aph* -Gen wurde, auf einem 1,3 kb großen *PstI* - Fragment lokalisiert, aus dem Vektor ptk7bkm isoliert und mit dem durch *PstI* linearisierten Vektor pRD87 -S1 bzw. -S3 ligiert. Der *E.coli* Stamm JM109 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und anschließend die Plasmide pEF2S1 und pEF2S3, welche das *aph* - Gen in der selben Orientierung wie das *ompA*\* - Gen inseriert haben, aus den Transformanden isoliert. Der Vektor pBAD18 (Pogliano u. Beckwith, 1994) trägt die regulatorischen Bestandteile des aus *E.coli* stammenden Arabinose - Operons: Das Genprodukt des *araC* - Gens reguliert die Expression der hinter den Promotor des Arabinoseoperons (*araB*, *araA*, *araD*) klonierten Gene. Die Transkription durch diesen Promotor wird durch L - Arabinose induziert (Englesberg et al., 1965; Greenblatt u. Schleif, 1971). Der Vektor vermittelt Ampicillinresistenz durch das  $\beta$ -Laktamasegen.

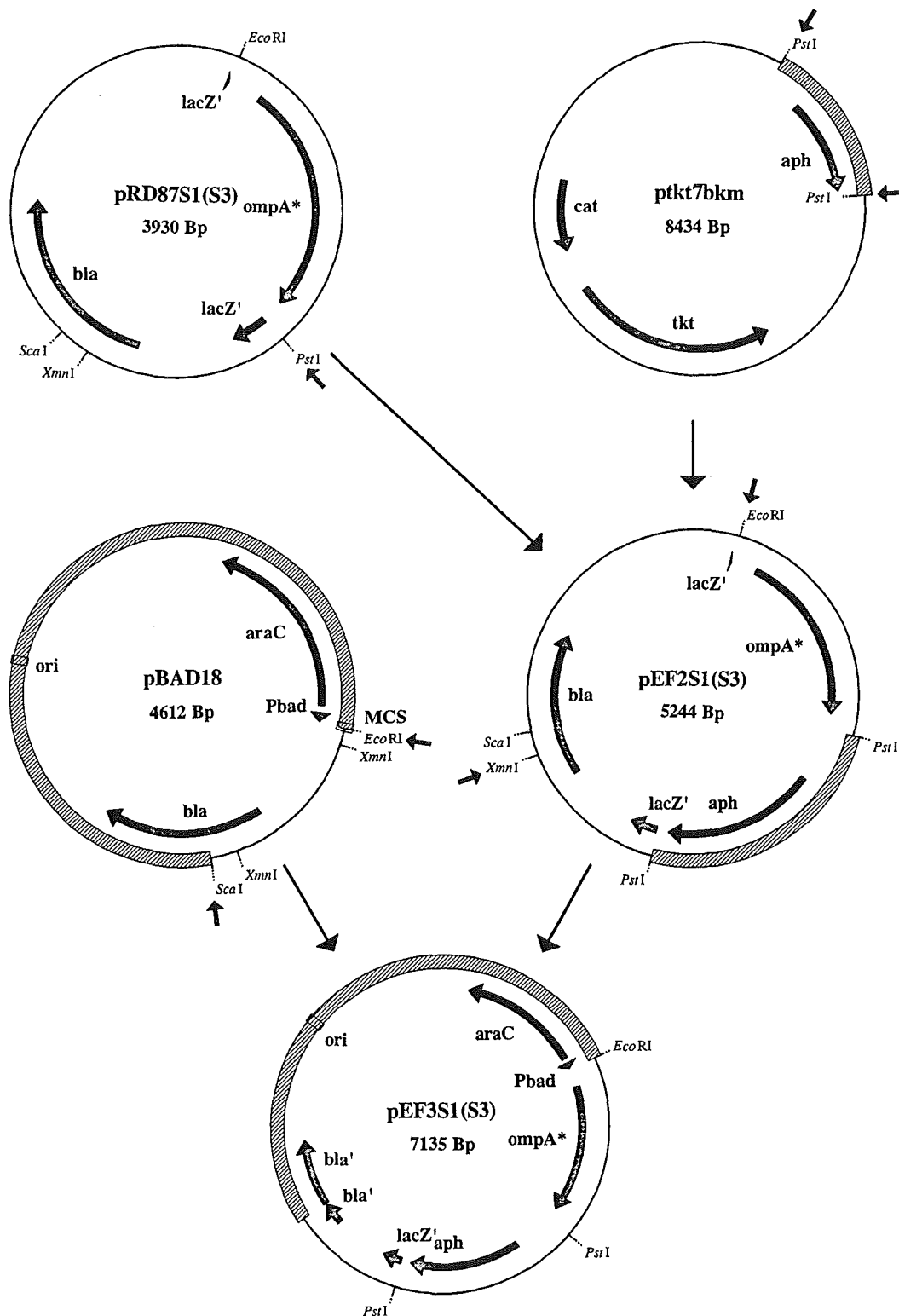


Abb. 4 : Schematische Darstellung der Konstruktion der Plasmide pEF3S1 bzw. pEF3S3 zur induzierbaren Expression der OmpA\* - Signalsequenzmutanten S1 bzw. S3. *aph* = Aminoglycosid 3' - phosphotransferasegen, *araC* = Gen für den Arabinose Aktivator bzw. Repressor, *bla* =  $\beta$  - Laktamasegen, *bla'* = unvollständiges  $\beta$  - Laktamasegen, *cat* = Chloramphenicol-acetyltransferasegen, *lacZ'* =  $\beta$  - Galactosidasegen ( $\alpha$  - Peptid - kodierender Bereich), *ompA\** = Gen für die OmpA - Signalsequenzmutanten S1 bzw. -S3, *tkt* = Transketolasegen, MCS = Multiple - Klonierungsstelle, Pbad = Arabinose - Promotor, ori = Replikationsursprung

Das Plasmid pBAD18 wurde mit *EcoRI* in der MCS und mit *ScaI* in dem  $\beta$ -Laktamasegen geschnitten. Der 3,74 kb große Vektoranteil wurde durch Agarose - Gelelektrophorese (2.6.1) von dem 875 Bp großen *EcoRI/ScaI* - Fragment getrennt, isoliert und mit dem 1,83 kb großen *EcoRI/XmnI* - Fragment des Plasmids pEF2S1 bzw. -S3 ligiert. Auf diesem *EcoRI/XmnI* - Fragment sind das *ompA* -S1 bzw. -S3 Gen, das *aph* - Gen, sowie ein Teil des  $\beta$ -Laktamase - Gens lokalisiert. Der *E.coli* Stamm JM109 wurde mit diesem Ligationsansatz transformiert (2.4.2). Transformanten mit dem Plasmid pEF3S1 bzw. -S3 wurden durch Selektion auf Kanamycin - haltigem Medium erhalten.

Die Plasmide pEF3S1 bzw. -S3 wurden so konstruiert, daß eine 121 Bp große Deletion in dem  $\beta$  - Laktamasegen entstand, welche zum Verlust der Ampicillinresistenz führte. Die Expression des *ompA* -S1 bzw. -S3 Gens war auf diesen Plasmiden durch L - Arabinose induzierbar. Die Induktion erfolgte jedoch nur in *E.coli* Stämmen wie z.B. MC1061, welche nicht zur Verstoffwechslung der L - Arabinose befähigt sind. Die Experimente zum Proteinexport in Gram - negativen Bakterien wurden daher mit diesem Stamm durchgeführt. Zur Charakterisierung des Exports der Plasmid - kodierten OmpA - Signalsequenzmutanten wurden OmpA - negative Spontanmutanten des Stammes MC1061 isoliert (2.4.4). Diese kein chromosomal - kodierte Wildtyp OmpA mehr synthetisierenden Mutanten wurden dann zur Expression der Modellproteine OmpA\* mit dem Plasmid pEF3S1 bzw. -S3 transformiert. Um den Einfluß der SecA - Überexpression auf den Export der OmpA - Signalsequenzmutanten bestimmen zu können, wurden diese Plasmid - haltigen Stämme anschließend mit dem pBR322 - Derivat pMF8 (*secA*) bzw. mit dem Kontrollplasmid pBR322 transformiert.

#### Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecA - Protein und der Überexpression in *E.coli*

Um auszuschließen, daß während der zur Plasmidpräparation des Vektors pMF8 durchgeführten Kultivierungen Mutationen aufgetreten waren, welche zur Expression von nicht funktionellem Plasmid - kodiertem SecA führten, wurde die Wachstumskomplementation des *E.coli* *secA5*<sup>ts</sup> Stammes MM52 durch das Plasmid pMF8 bzw. durch das Kontrollplasmid pBR322 zum Nachweis von funktionellem SecA - Protein untersucht (2.4.3). Das Wachstum des Stammes MM52 wurde bei der nicht - permissiven Temperatur von 42°C nur durch das Plasmid pMF8 komplementiert. Dies beweist, daß das zur Transformation des Stammes MC1061/pEF3S1 bzw. -S3 verwendete Plasmid pMF8 demnach ein funktionelles SecA - Protein exprimiert.

Die SecA - Expression, sowohl durch das chromosomale als auch durch das von dem Plasmid - pMF8 kodierte *secA* - Gen unterliegt der Autoregulation, an welcher der intergenische Bereich zwischen dem stromaufwärts gelegenen *GenX* und dem *secA* - Gen beteiligt ist (Schmidt et al., 1991). Es mußte demnach weiterhin nachgewiesen werden, daß durch das Einführen einer Plasmid - kodierten *secA* - Kopie in dem Stamm MC1061/pEF3S1 bzw. -S3/pMF8 gegenüber dem Kontrollstamm (MC1061/pEF3S1 bzw. -S3/pBR322) tatsächlich mehr SecA synthetisiert

wurde. Kulturen dieser Stämme wurden daher bis zum exponentiellen Wachstum angezogen, die OmpA\* - Synthese wurde mit L - Arabinose induziert bzw. die Kulturen ohne Zusatz des Induktors weiter inkubiert. Proben dieser Kulturen wurden in der exponentiellen wie auch in der stationären Wachstumsphase entnommen und auf gleiche Zellzahlen normierte Gesamtzell-extrakte dieser Proben durch SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese getrennt (2.5.2). Zum spezifischen Nachweis der in den Stämmen exprimierten SecA - Proteine wurde anschließend ein "Western Blot" (2.5.3) mit *E.coli* SecA - Antikörpern durchgeführt. Abb. 5 zeigt die SecA-Proteinmengen, welche während des exponentiellen Wachstums der Stämme nach einer einstündigen Induktion der OmpA\* - Synthese bzw. ohne Zusatz des Induktors in den Gesamt-zellextrakten nachgewiesen wurden:

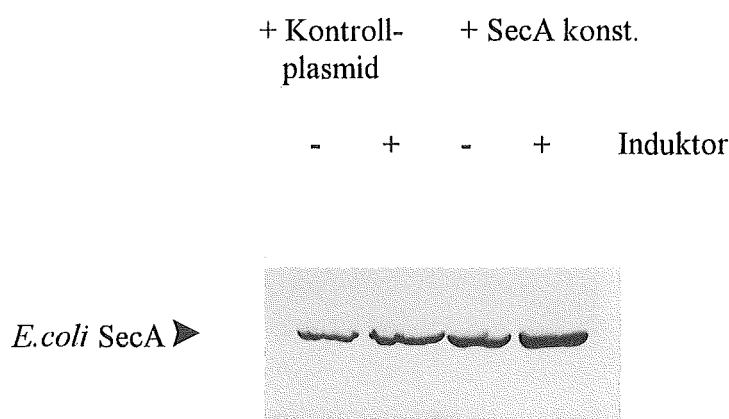


Abb. 5: "Western Blot" mit spezifischen Antikörpern gegen *E.coli* SecA zum Nachweis des SecA - Proteins in den Stämmen MC1061ompA<sup>-</sup>/pEF3S3/pBR322 (+ Kontrollplasmid) und MC1061ompA<sup>-</sup>/pEF3S3/pMF8 (+ SecA konstitutiv). Gesamtzell-extrakte beider Stämme nach einstündiger Inkubation in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) des Induktors zur OmpA\* - Synthese L - Arabinose (0,2%)

In den Proben des Kontrollstammes (pEF3S3/pBR322) war das 102 kDa große, ausschließlich chromosomal - kodierte SecA nachweisbar. Die synthetisierte Proteinmenge war unabhängig von der Anwesenheit der die OmpA\* - Expression induzierenden Arabinose. Der mit dem Plasmid pMF8 transformierte Stamm zeigte eine gegenüber dem Kontrollstamm deutlich erhöhte SecA - Menge. Die SecA - Synthese wurde auch hier durch den Zusatz des Induktors nicht beeinflusst.

Das Einfügen zusätzlicher *secA* - Genkopien führte sowohl während des exponentiellen Wachstums, als auch in der stationären Wachstumsphase (Daten nicht gezeigt) wegen des Gen-Dosis - Effekts zu der angestrebten deutlichen Steigerung der zellulären SecA - Proteinmenge.

### Einfluß einer erhöhten SecA - Konzentration auf den Export der OmpA\* - Signalsequenzmutanten

Um den Einfluß dieser gegenüber dem Wildtyp erhöhten SecA - Konzentration auf den Export der OmpA - Signalsequenzmutanten bestimmen zu können, wurde das Verhältnis zwischen nicht exportiertem und exportiertem und somit prozessiertem OmpA\* - Protein in diesen Kulturen bestimmt. Dazu wurden die bereits zum SecA - Nachweis hergestellten Gesamtzellextrakte dieser Kulturen mit OmpA - spezifischen Antikörpern geblottet (2.5.3).

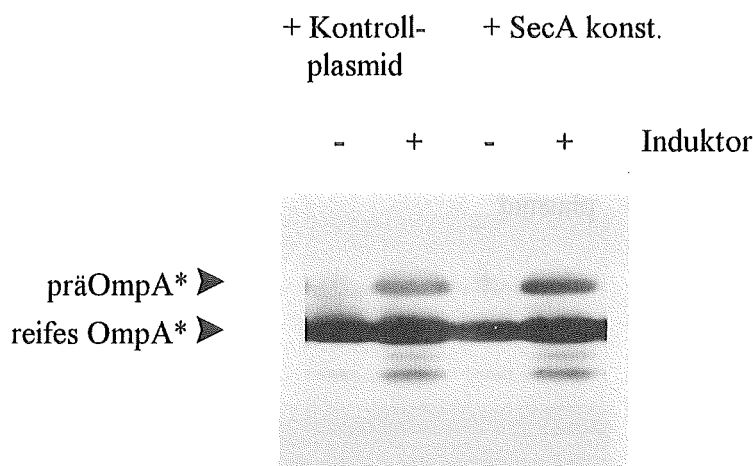


Abb. 6: "Western Blot" mit OmpA - spezifischen Antikörpern zur Untersuchung des Exports der OmpA - Signalsequenzmutante S3 bei unterschiedlichen zellulären SecA - Konzentrationen. Gesamtzellextrakte der Stämme MC1061*ompA*<sup>-</sup>/pEF3S3/pBR322 (+ **Kontrollplasmid**) und MC1061*ompA*<sup>-</sup>/pEF3S3/pMF8 (+ **SecA konstitutiv**) nach einstündiger Induktion (+) der OmpA\* - Synthese durch L - Arabinose (0,2%) bzw. bei Abwesenheit des Induktors (-)

Wie Abb. 6 zeigt, war in dem Kontrollstamm reifes OmpA\* (36 kDa) auch unter nicht induzierten Bedingungen wegen der unvollständigen Repression des Arabinose - Promotors nachweisbar. Die OmpA\* - Expression war unter nicht - induzierten Bedingungen jedoch so gering, daß das gesamte als Vorläufer synthetisierte OmpA\* exportiert und zu reifem OmpA\* prozessiert wurde. Entsprechende Verhältnisse liegen bei der Expression chromosomal kodierter OmpA - Wildtypmengen vor (Daten nicht gezeigt). Die Induktion führte bei dem Kontrollstamm zur Überproduktion des Plasmid - kodierten OmpA\*. Neben reifem OmpA\* war ein erheblicher Teil der gesamten OmpA\* - Menge als nicht exportierter Vorläufer nachweisbar. Die OmpA\* -Überproduktion führte offensichtlich zur Überlastung des Exportapparates und zur Akkumulation von in eine exportinkompetente Konformation gefalteten Vorläufers. Welchen Einfluß hat nun die erhöhte SecA - Menge in dem Stamm MC1061*ompA*<sup>-</sup>/pEF3S3/pMF8 auf den Export des OmpA\* - Proteins? Wie bei dem Kontrollstamm war unter nicht

induzierten Bedingungen nur reifes OmpA\* nachweisbar. Die Induktion führte ebenfalls zur Vorläuferakkumulation, nur ein Teil des synthetisierten OmpA\* wurde exportiert und somit prozessiert. Das Verhältnis von präOmpA\* zu reifem OmpA\* war in beiden Stämmen gleich. Die Erhöhung der zellulären SecA - Konzentration führte unter diesen Bedingungen demnach nicht zu einer Verbesserung des OmpA\* - Exports, d.h. die SecA - Proteinmenge ist für die Sekretion in *E.coli* offensichtlich nicht limitierend.

Mit den durchgeführten "Western Blot" - Experimenten konnten jedoch nur stationäre Zustände untersucht werden, so daß graduelle Unterschiede in der Exportkinetik eines Proteins nicht erfaßt wurden. Aus diesem Grund wurde die OmpA\* - Exportkinetik bei unterschiedlichen zellulären SecA - Konzentrationen durch "pulse chase" - Experimente (2.5.4) bestimmt. Die bereits beschriebenen Stämme, welche Wildtypmengen des SecA - Proteins synthetisieren (MC1061ompA<sup>-</sup>/pEF3S3/pBR322), bzw. das SecA überexprimieren (MC1061ompA<sup>-</sup>/pEF3S3/ pMF8), wurden in M9 - Minimalmedium angezogen. Um den Einfluß der SecA - Überexpression auf den OmpA\* - Export bei unterschiedlich starker Vorläuferakkumulation bestimmen zu können, wurde die OmpA\* - Synthese dann durch L -Arabinose für 5 min, 10 min, 15 min oder 2h 15 min induziert. Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse gezeigt, welche durch die Charakterisierung der für 2h 15 min induzierten Proben, erhalten wurden: Nach der "pulse" - Markierung wurden zu den angegebenen "chase" - Zeiten Proben entnommen und eine Immunfällung durchgeführt. Durch die Copräzipitation mit *E.coli* SecA - spezifischen Antikörpern und OmpA - Antiserum wurde das in Abb. 7 dargestellte Ergebnis erhalten: Die bei dem Molekulargewicht von 102 kDa sichtbaren Banden entsprechen dem *E.coli* SecA. Die Quantifizierung der einzelnen "chase" - Proben durch Scintillationsmessung (2.5.5) ergab, daß der mit dem Plasmid pMF8 (*secA*) transformierte Stamm mit durchschnittlich 3009 cpm eine gegenüber dem Kontrollstamm (1378 cpm) etwa zweifach erhöhte SecA - Menge exprimiert. In dem Kontrollstamm lag unmittelbar nach der "pulse" - Markierung fast ausschließlich nicht prozessiertes präOmpA\* vor. Der markierte Vorläufer wurde innerhalb von 10 min nahezu vollständig in reifes OmpA\* überführt. In dem das SecA überexprimierenden Stamm (MC1061ompA<sup>-</sup>/pEF3S3/pMF8) entspricht das zu den jeweiligen "chase" - Zeiten bestimmte Verhältnis von nicht prozessiertem Vorläufer zu exportiertem reifem OmpA\* genau den Verhältnissen, welche für den Kontrollstamm ermittelt wurden. Dies bedeutet, daß das präOmpA<sup>3</sup> in beiden Stämmen mit gleicher Kinetik prozessiert bzw. exportiert wurde. Das identische Ergebnis wurde auch nach kürzeren Induktionszeiten (s.o.), d.h. bei geringeren Vorläuferakkumulationen erhalten (Daten nicht gezeigt). Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen "Western Blot" - Experimente, sowie die hier erläuterten "pulse chase" Versuche wurden ebenfalls zur Charakterisierung des Exports der Signalsequenzmutante S1 durchgeführt. Durch die mit dieser Mutante erzielten Ergebnisse wurde bestätigt, daß die zelluläre SecA - Konzentration den Export beider OmpA\* - Signalsequenzmutanten unter Überproduktionsbedingungen in *E.coli* offensichtlich nicht limitiert.

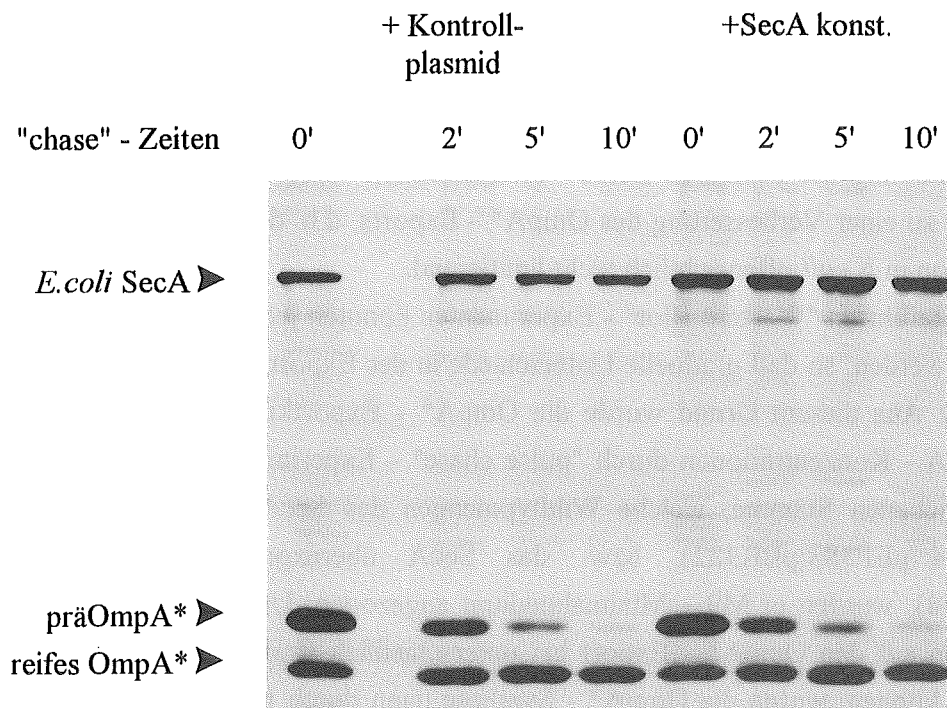


Abb. 7: Prozessierungskinetik des präOmpA\* - Proteins in den Stämmen MC1061ompA<sup>-</sup> pEF3S3/pBR322 (+ Kontrollplasmid) und MC1061ompA<sup>-</sup> pEF3S3/pMF8 (+ SecA konstitutiv). Induktion der OmpA\* - Synthese für 2 h 15 min. Anzucht, "pulse" - Markierung (2 min) und Probenahme zu den angegebenen "chase" - Zeiten bei 30°C. Copräzipitation mit *E. coli* SecA - und OmpA - spezifischen Antiseren.

### 3.1.2 Einfluß einer erhöhten SecB - Konzentration auf den Export des *E. coli* Außenmembranproteins OmpA\*

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß die zelluläre SecA - Konzentration den Export des OmpA\* - Proteins unter Überproduktionsbedingungen nicht limitiert. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob das cytoplasmatische Chaperon SecB für den Proteinexport unter diesen Bedingungen einen limitierenden Faktor darstellt. Daher wurde der Einfluß einer gegenüber der Wildtypmenge erhöhten SecB - Konzentration auf den Export der OmpA\* - Signalsequenzmutanten bestimmt. Entsprechende Versuche wurden wie zur Untersuchung der Limitation durch das SecA - Protein durchgeführt:

#### Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecB - Protein und Überexpression in *E. coli*

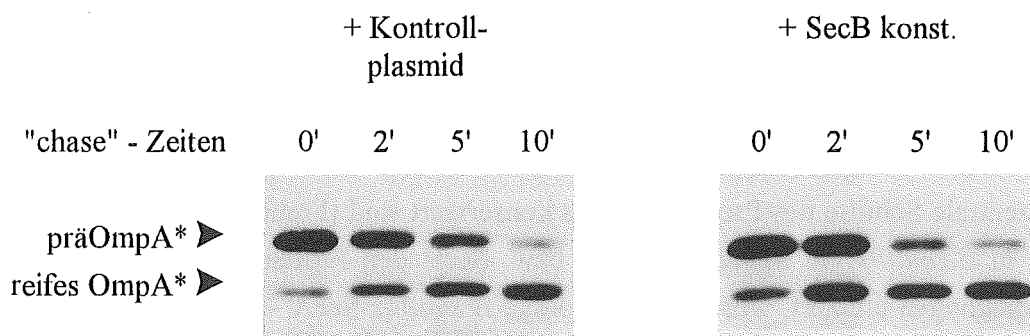
Das Plasmid pRH407 (Hengge - Aronis, 1990) ist ein Derivat des Vektors pBR325 mit einem chromosomalen Insert aus *E. coli*, auf welchem das für die Glyzerinphosphatdehydrogenase kodierende Gen *gpsA* und das *secB* - Gen lokalisiert sind. Durch die Transformation der entsprechenden Stämme mit diesem Plasmid sollte die zelluläre SecB - Konzentration in *E. coli* erhöht werden. Durch Komplementation des Wachstums der *E. coli* SecB - Nullmutante CK1953 auf Vollmedium (2.4.3) wurde das Plasmid pRH407 bezüglich der Expression von



funktionellem SecB - Protein getestet. Das Wachstum des Stammes CK1953 auf Vollmedium wurde durch pRH407 komplementiert, nicht jedoch durch den Kontrollvektor pBR325. Das Plasmid pRH407 exprimierte demnach funktionelles SecB - Protein und wurde daher für die weiteren Experimente eingesetzt.

#### Einfluß einer erhöhten SecB - Konzentration auf den Export der OmpA - Signalsequenzmutanten

Der OmpA - negative Stamm MC1061, welcher bereits das Plasmid (pEF3S1 bzw. -S3) zur induzierbaren Expression der OmpA - Signalsequenzmutante S1 bzw. S3 trägt, wurde mit dem Plasmid pRH407 (*secB*) bzw. dem Kontrollplasmid pBR325 transformiert. Mit diesen Stämmen wurden "pulse chase" - Experimente durchgeführt. Zur Einstellung unterschiedlich starker Vorläuferakkumulationen wurde auch hier die OmpA\* -Synthese vor der "pulse" - Markierung in der exponentiellen Wachstumsphase für 5 min, 10 min, 15 min oder 2h 15 min induziert. Exemplarisch werden im folgenden die Ergebnisse gezeigt, welche durch die Charakterisierung der für 2h 15 min induzierten Proben, erhalten wurden:



**Abb. 8: Prozessierungskinetik des präOmpA\* - Proteins in den Stämmen MC1061 *ompA*<sup>-</sup>/pEF3S1/pBR325 (+ Kontrollplasmid) und MC1061 *ompA*<sup>-</sup>/pEF3S1/pRH407 (+ SecB konstitutiv). Induktion der OmpA\* - Synthese für 2 h 15 min. Anzucht, "pulse" - Markierung (2 min) und Probenahme zu den angegebenen "chase" - Zeiten bei 30°C. Präzipitation mit OmpA - spezifischem Antiserum.**

Zu den in Abb. 8 angegebenen "chase" - Zeiten wurden Proben entnommen und für die SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese aufgearbeitet. Der direkte Nachweis einer SecB - Überexpression in dem mit dem Plasmid pRH407 transformierten Stamm wurde nicht durchgeführt, da zahlreiche Literaturdaten zeigen, daß in *E.coli* die zusätzliche Expression von Plasmid-kodiertem SecB - Protein in Zellen, welche Wildtypmengen von chromosomal - kodiertem SecB synthetisieren, zu einer deutlich erhöhten Menge von stabilem Protein führte (Kumamoto u. Beckwith, 1985; Kumamoto u. Nault., 1989; Weiss et al., 1988). Durch die Präzipitation mit OmpA - spezifischen Antikörpern wurde das in Abb. 8 dargestellte Ergebnis erhalten: In dem

J

Kontrollstamm wurde markiertes präOmpA\* innerhalb von 10 min nahezu vollständig zu reifem OmpA prozessiert und exportiert. Der Stamm, welcher neben chromosomal - kodiertem auch Plasmid - kodiertes SecB synthetisiert (MC1061ompA<sup>-</sup>/pEF3S1/pRH407), exportierte das OmpA\* - Protein mit der selben Kinetik wie der Kontrollstamm. Das identische Ergebnis wurde auch nach kürzeren Induktionszeiten (s.o.), d.h. bei geringeren Vorläuferakkumulationen erhalten. Ein analoges Ergebnis wurde auch mit dem OmpAS3 - Protein erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, daß die zelluläre SecB - Konzentration unter Überproduktionsbedingungen für die Proteinsekretion in *E.coli* offensichtlich ebenfalls nicht limitierend ist.

### 3.2 Untersuchungen zum Proteinexport Gram - positiver Bakterien

Die massive Überproduktion sekretorischer Proteine führt ebenso wie bei den Gram - negativen Bakterien auch bei den Gram - positiven Organismen zu einer Überlastung der Sekretionskapazität und zur intrazellulären Vorläuferakkumulation (Freudl, 1992; Sibakov et al., 1984; Ulmanen et al., 1985). Die Überexpression der an dem limitierenden Schritt beteiligten zellulären Komponenten könnte somit auch bei den Gram - positiven Bakterien zu einer Verbesserung der Exportkapazität führen. Die Identifizierung von *B.subtilis* - Genen, deren Genprodukte zu den Sec - Proteinen von *E.coli* (SecA, SecE, SecY) homolog sind spricht dafür, daß zumindest zentrale Schritte des Proteinexportes konserviert sind (Freudl, 1992). Um zu untersuchen, ob in *B.subtilis* die Menge an SecA bzw. SecB den Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen limitiert, wurde das homologe *B.subtilis* SecA - Protein überexprimiert, bzw. das heterologe *E.coli* SecB - Protein in *B.subtilis* exprimiert.

#### 3.2.1 Einfluß der *B.subtilis* SecA - Überexpression auf den Export der Lipase aus *Staphylococcus hyicus*

##### Induzierbare Expression der Lipase aus *S. hyicus*

Bei den mit *B.subtilis* durchgeführten Experimenten wurde die Lipase aus *S. hyicus* als sekretorisches Modellprotein verwendet. Diese Lipase wird als Präproprotein synthetisiert. Bei der Expression der Lipase in *S. hyicus* wird das Signalpeptid während der Translokation abgespalten und das Protein als Prolipase in das Medium freigesetzt. Die Abspaltung des Propeptids zur reifen Lipase erfolgt anschließend durch die proteolytische Aktivität extrazellulärer Proteasen (Götz et al., 1985; Wenzig et al., 1990). Bei der moderaten Expression der Lipase in *B.subtilis* wird das gesamte synthetisierte Enzym sekretiert und ist ausschließlich als reife Form im Kulturüberstand nachweisbar. Wird das Lipasegen in *B.subtilis* jedoch durch einen starken Promotor transkribiert, akkumuliert der größte Teil der synthetisierten Lipase intrazellulär als Präproenzym; nur ein Teil ist unter diesen Überproduktionsbedingungen im Kulturüberstand als

reifes Protein nachweisbar. (Diplomarbeit Frings, 1990). Zur induzierbaren Überproduktion der Lipase wurde der *B.subtilis* Stamm DB104 mit dem Plasmid pJM10 transformiert. Auf diesem Plasmid erfolgt die Lipaseexpression durch den mit IPTG induzierbaren und durch den Plasmid - kodierten Lac - Repressor regulierbaren Bakteriophagenpromotor P<sub>N25</sub>/ *lac* - Operator (Meens et al., 1993). Als Resistenzmarker trägt der Vektor das für die Chloramphenicol-transacetylase kodierende Gen.

#### Konstruktion des Plasmids pWHsecA

Zur induzierbaren Überexpression des homologen SecA - Proteins in *B.subtilis* wurde das Plasmid pWHsecA (Abb. 9) konstruiert. Der Vektor pWH1520 ist ein Pendel - Vektor für *Bacillus* und *E.coli* mit dem Promotor und dem Repressorgen des aus *B.megaterium* stammenden Operons zur Xyloseverwertung (Rygus u. Hillen, 1991). Das Plasmid wurde in der stromabwärts des Xylose Promotors gelegenen MCS mit *SpeI* und *Asp718* geschnitten und der Vektoranteil isoliert. Das *B.subtilis* *secA* - Gen wurde mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotide Bs1 und Bs2 und unter Verwendung des Plasmids pMKL4 (Klose et al., 1993) mittels PCR (2.6.3) amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde an den durch die Oligonukleotide eingeführten singulären Schnittstellen mit *XbaI* und *Asp718* geschnitten und mit dem Vektoranteil des Plasmids pWH1520 (*SpeI* und *Asp718*) ligiert. Auf dem resultierenden Plasmid pWHsecA ist die Expression des *B.subtilis* SecA - Proteins durch Xylose induzierbar.

#### Nachweis von funktionellem, Plasmid - kodiertem SecA - Protein und Überexpression in *B.subtilis*

Die Plasmid (pWHsecA) - vermittelte Expression von funktionellem SecA - Protein in *B.subtilis* wurde durch die Komplementation des Wachstums der temperatursensitiven *B.subtilis* *secA* - Mutante NIG1152 (2.4.3) nachgewiesen: Wegen des Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an der Position 431 des SecA - Proteins wächst diese *B.subtilis* Mutante bei der permissiven Temperatur von 30°C, jedoch nicht mehr bei 42°C (Takamatsu et al., 1992). Das Wachstum dieser mit dem Plasmid pWHsecA bzw. mit dem Kontrollplasmid pWH1520 transformierten temperatursensitiven *B.subtilis* Mutante wurde bei der permissiven und bei der nicht - permissiven Temperatur untersucht. Durch die Synthese von Plasmid - kodiertem SecA - Protein wurde der Wachstumsdefekt der Mutante durch das Plasmid pWHsecA nach Xylose - Zugabe bei der nicht - permissiven Temperatur vollständig komplementiert. Der Vektor pWH1520 führte hingegen erwartungsgemäß nicht zur Wachstumskomplementation.

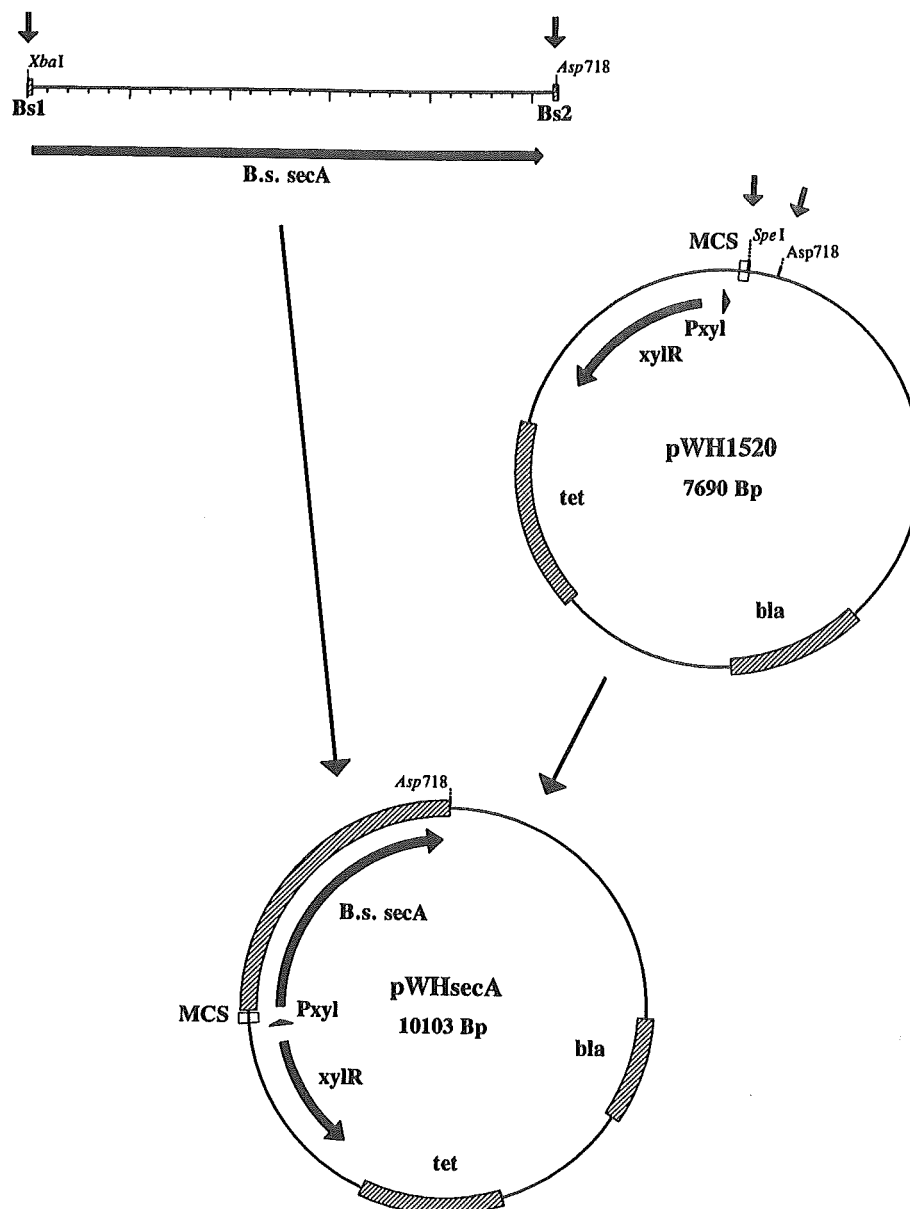


Abb. 9: **Konstruktion des Plasmids pWHsecA** zur induzierbaren Expression des SecA - Proteins in *B.subtilis*. *bla* =  $\beta$  - Laktamasesgen, *B.s. secA* = *secA* - Gen aus *B.subtilis*, *tet* = Tetracyclin - Resistenzgen, *xylR* = Gen für den Xylose - Repressor, *BsaI*, *Bsa2* = spez. Oligonukleotide, MCS = Multiple - Klonierungsstelle, *PxyI* = Xylose - Promotor

#### Nachweis der Überexpression des SecA - Proteins in *B.subtilis* und Beeinflussung des Lipase-exportes

Der *B.subtilis* Stamm DB104 wurde zunächst mit dem Plasmid pJM10 zur Lipaseüberproduktion und anschließend mit dem Vektor pWHsecA bzw. dem Kontrollplasmid pWH1520 transformiert. Kulturen beider Stämme wurden angezogen und die Lipasesynthese mit IPTG induziert. Die Kulturen wurden geteilt und zur Induktion der Expression von Plasmid - ko-

diertem SecA wurde dem einen Teil Xylose zugesetzt. Die andere Hälfte wurde hingegen ohne Xylose weiterinkubiert. Während des weiteren Wachstums wurden in regelmäßigen Abständen Proben dieser Kulturen genommen und für die SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (2.5.2) aufgearbeitet. Zum Nachweis des SecA - Proteins wurden die auf gleiche Zellzahlen normierten Zellextrakte (2.5.1) mit spezifischen Antikörpern gegen *B.subtilis* SecA geblottet (2.5.3). Exemplarisch sind in Abb. 10 die zellulären SecA - Proteinmengen dargestellt, welche in exponentiell wachsenden *B.subtilis* - Zellen nach einer dreistündigen Induktion im "Western Blot" nachweisbar waren:

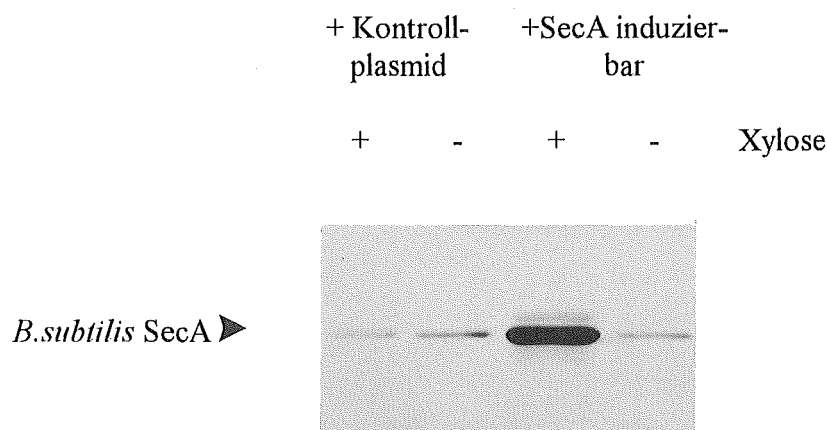


Abb. 10: "Western Blot" mit *B.subtilis* SecA - spezifischen Antikörpern zum Nachweis der SecA - Überexpression in *B.subtilis*, Gesamtzellextrakte der Stämme DB104/pJM10/pWH1520 (+ **Kontrollplasmid**) und DB104/pJM10/pWHsecA (+ **SecA induzierbar**) nach dreistündiger Induktion (+) des Plasmid - kodierten SecA - Proteins bzw. bei Abwesenheit des Induktors Xylose (-)

In dem mit dem Kontrollplasmid pWH1520 transformierten *B.subtilis* Stamm repräsentiert das 98 kDa große, im Zellextrakt nachgewiesene Protein das ausschließlich chromosomal - kodierte SecA - Protein. Die zelluläre SecA - Konzentration ist hier erwartungsgemäß unabhängig von der Anwesenheit der Xylose. Im Gegensatz dazu führte die Xyloseinduktion im Fall des *B.subtilis* Stammes mit dem Plasmid pWHsecA zur Expression von Plasmid - kodiertem SecA und daher zu einer gegenüber dem Wildtypniveau (ohne Xylosezugabe) deutlich erhöhten zellulären SecA - Konzentration.

Um den Einfluß dieser SecA - Überexpression auf den Lipaseexport bestimmen zu können, wurden die auf äquivalente Zellzahlen bezogenen Proben der Zellextrakte und jeweils zwei Parallelproben der Kulturüberstände mit Lipase - spezifischem Antiserum geblottet (Abb. 11): Der Kontrollstamm akkumulierte einen Teil des als Präprolipase synthetisierten Vorläufers von

94 kDa intrazellulär. Nur ein Teil der gesamten Lipase wurde exportiert und war als reife Lipase mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa im Überstand nachweisbar. In dem Stamm DB104 pJM10/pWHsecA, welcher das SecA - Protein unter diesen induzierten Bedingungen überexprimiert (s.o.) akkumulierte ebenfalls einen Teil der gesamten Lipase intrazellulär; auch hier wurde nur ein Teil als reife Lipase ins Kulturmedium exportiert.

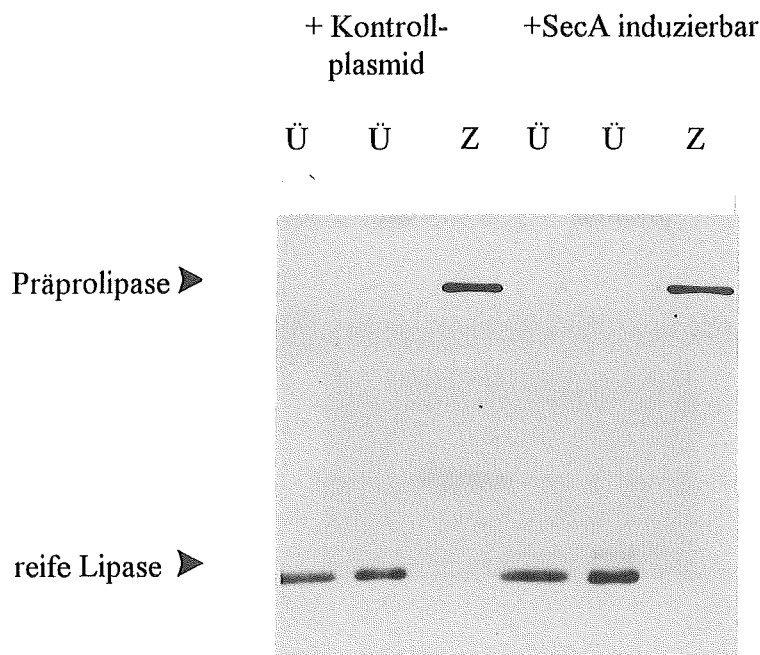


Abb. 11: "Western Blot" mit Lipase - spezifischen Antikörpern zur Bestimmung des Exports der Lipase in *B.subtilis* bei unterschiedlichen zellulären SecA - Konzentrationen, Gesamtzellextrakte (Z) und Parallelproben der Kulturüberstände (Ü) der Stämme DB104/pJM10/pWH1520 (+ Kontrollplasmid) und DB104/pJM10/pWHsecA (+ SecA induzierbar) nach dreistündiger Induktion des Plasmid - kodierten SecA - Proteins

Sowohl das Verhältnis von akkumulierter Präprolipase zu reifem Protein, als auch die absoluten Mengen der exportierten reifen Lipase waren in beiden *B.subtilis* Stämmen gleich, d.h. die SecA - Überexpression führte unter Überproduktionsbedingungen nicht zu einer Exportverbesserung. Hieraus folgt, daß die zelluläre SecA - Konzentration, analog zur Situation in *E.coli*, für den Proteinexport in *B.subtilis* anscheinend nicht limitierend ist.

### 3.2.2 Einfluß der Expression des *E.coli* SecB - Proteins auf den Export der Lipase in *B.subtilis*

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, daß der Proteinexport in *B.subtilis* durch die zelluläre SecA - Konzentration nicht limitiert ist. Es wurde daher untersucht, ob die Expression des

exportspezifischen Chaperons SecB in *B.subtilis* zu einer Exportverbesserung führt. Da bisher in keinem Gram -, positiven Organismus ein SecB - homologes Protein identifiziert werden konnte, wurde der Einfluß der Expression des heterologen SecB - Proteins aus *E.coli* in *B.subtilis* auf den Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen untersucht.

#### Konstruktion des Plasmids pWHsecB

Zur induzierbaren Expression des heterologen *E.coli* SecB - Proteins in *B.subtilis* wurde das Plasmid pWHsecB (Abb. 12) konstruiert. Der Vektor pWH1520 wurde in der stromabwärts des Xylose Promotors gelegenen MCS mit *SpeI* und *Asp718* geschnitten und der Vektoranteil isoliert. Das *E.coli* *secB* - Gen wurde mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotide Ec1 und Ec2 und unter Verwendung des Plasmids pRH407 als Template (Clark et al., 1980) mittels PCR (2.6.3) amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde an den durch die Oligonukleotide eingeführten Schnittstellen mit *SpeI* und *Asp718* geschnitten und in den mit den selben Enzymen gespaltenen Vektoranteil des Plasmids pWH1520 ligiert. Auf dem resultierenden Plasmid pWHsecB ist die Expression des *E.coli* SecB - Proteins in *B.subtilis* durch Xylose induzierbar. Der Nachweis, daß durch das Plasmid pWHsecB funktionelles SecB - Protein exprimiert wird, konnte hier nicht durch den Test auf Wachstumskomplementation einer *E.coli* *secB* - Mutante geführt werden, da der Xylose - Promotor in *E.coli* nicht induziert werden kann. Um PCR - Fehler und somit potentiell die SecB - Expression beeinträchtigende Mutationen ausschließen zu können, wurde das gesamte auf dem Plasmid pWHsecB lokalisierte Insert (*secB* - Gen mit angrenzenden nichtkodierenden Bereichen) mit Hilfe der spezifischen Primer WH1 und WH2 sequenziert. Die ermittelte Sequenz entspricht der des Wildtyp *secB* - Gens aus *E.coli*, so daß von der Expression von funktionellem SecB - Protein durch das Plasmid pWHsecB in *B.subtilis* ausgegangen werden konnte.

#### Expression des heterologen *E.coli* SecB - Proteins in *B.subtilis* und Effekt auf den Lipase-export

Um den Einfluß der Expression des *E.coli* SecB - Proteins auf den Export der Lipase in *B.subtilis* bestimmen zu können, wurde der *B.subtilis* Stamm DB104 zunächst zur induzierbaren Lipaseexpression mit dem Plasmid pJM10 (Meens et al., 1993) und anschließend mit dem Plasmid pWHsecB bzw. dem Kontrollplasmid pWH1520 transformiert. Zunächst wurde die Expression des *E.coli* SecB - Proteins in dem mit pWHsecB transformierten Stamm nachgewiesen. Dazu wurde dieser Stamm (DB104/pJM10/pWHsecB) und der Kontrollstamm (DB104/pJM10/pWH1520) angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase zur Lipase-induktion mit IPTG versetzt. Die Kulturen wurden geteilt und der einen Hälfte zur Expression des SecB - Proteins zusätzlich Xylose zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubation für drei Stunden wurden Proben der Kulturüberstände und der Zellpellets genommen und aufgearbeitet (2.5.1). Zum Nachweis der Expression des SecB - Proteins wurden die auf gleiche Zellzahlen bezogenen Proben der Zellextrakte mit *E.coli* SecB spezifischen Antikörpern geblottet. Die

Abb. 13 zeigt, daß in dem Kontrollstamm erwartungsgemäß kein SecB - Protein nachweisbar war und keine Kreuzreaktivität mit *Bacillus* - Proteinen auftrat. Der mit dem Plasmid pWHsecB transformierte Stamm exprimierte hingegen das SecB - Protein Xylose abhängig.

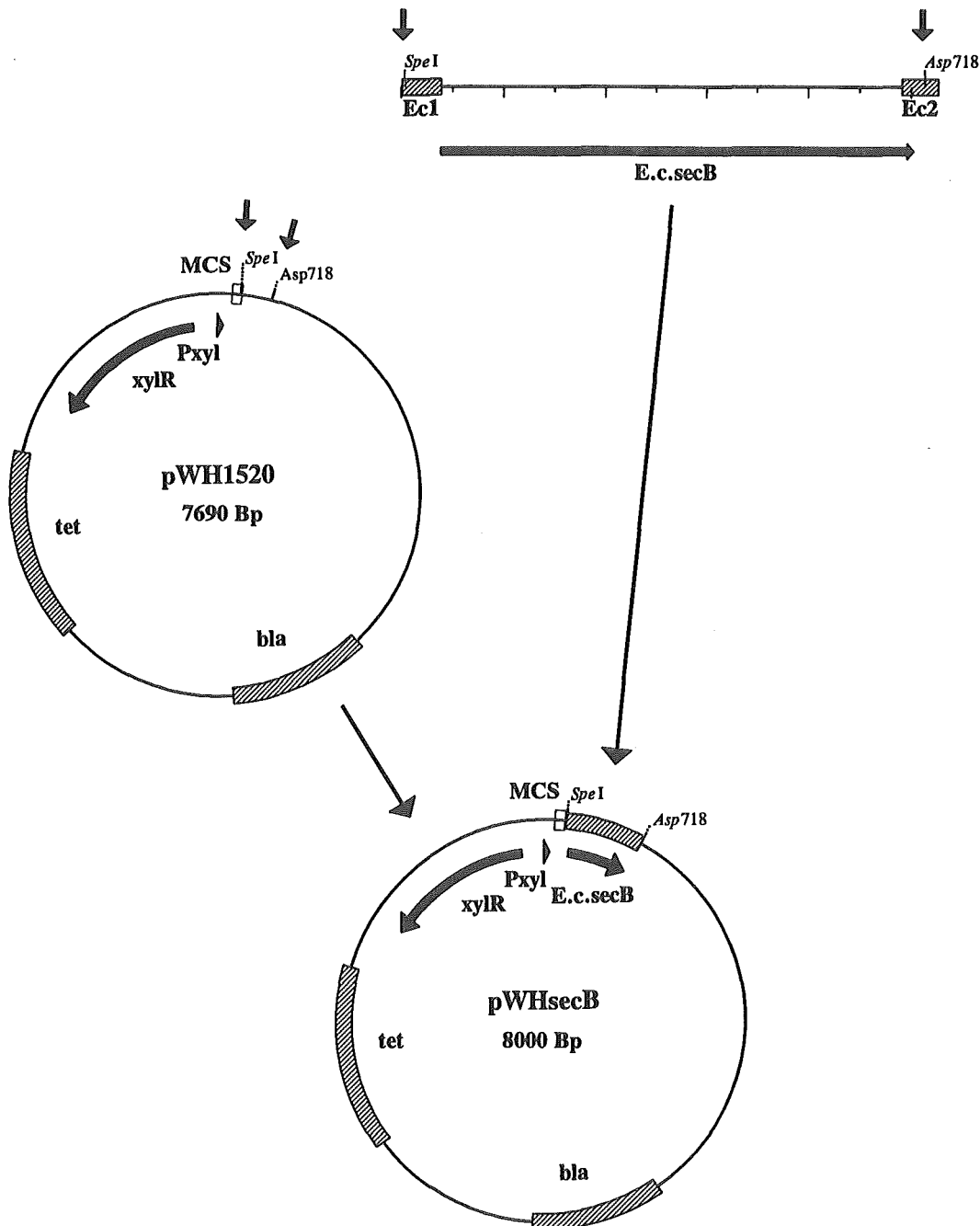


Abb. 12: Konstruktion des Plasmids pWHsecB zur induzierbaren Expression des *E.coli* SecB - Proteins in *B.subtilis*. *bla* =  $\beta$  - Laktamasesgen, *E.c. secB* = *secB* - Gen aus *E.coli*, *tet* = Tetracyclin - Resistenzgen, *xylR* = Gen für den Xylose - Repressor, Ec1, Ec2 = spez. Oligonukleotide, MCS = Multiple - Klonierungsstelle, *Pxyl* = Xylose - Promotor



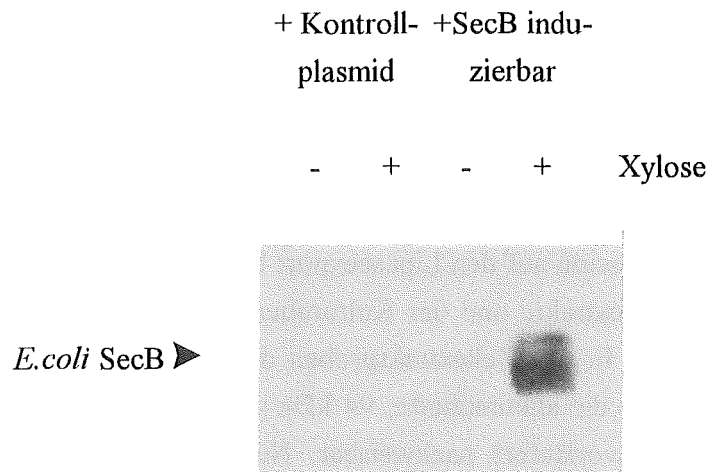


Abb.13: "Western Blot" mit Antikörpern gegen das *E.coli* SecB - Protein zum Nachweis der SecB - Expression in *B.subtilis*. Gesamtzellextrakte der Stämme DB104/pJM10/pWH1520 (+ Kontrollplasmid) und DB104/pJM10/pWHsecB (+ SecB induzierbar) nach dreistündiger Induktion des SecB - Proteins (+) bzw. ohne Zusatz des Induktors Xylose (-).

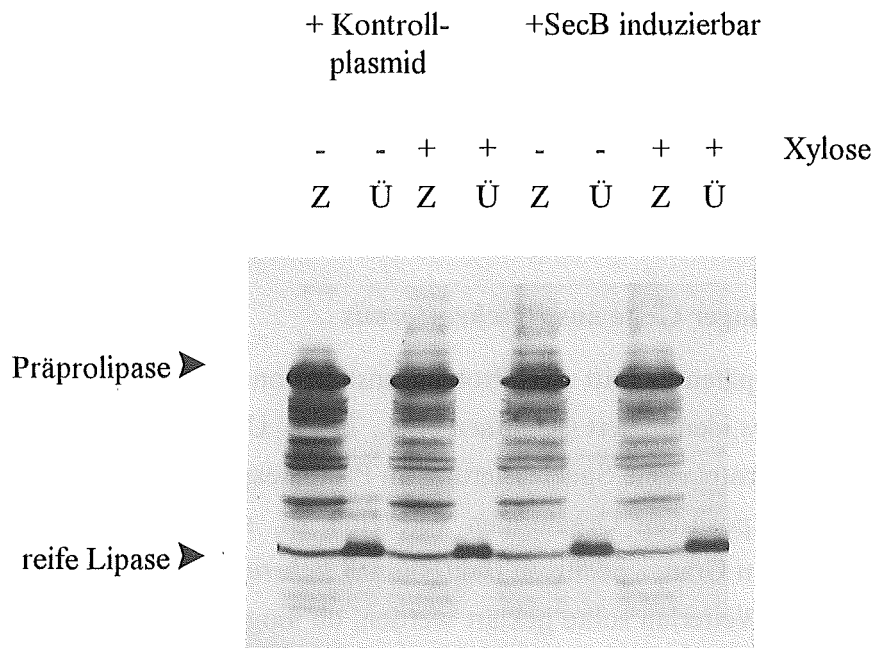


Abb.14: "Western Blot" mit Lipase - spezifischen Antikörpern zur Bestimmung des Einflusses der Expression des *E.coli* SecB - Proteins auf den Export der Lipase in *B.subtilis*. Gesamtzellextrakte (Z) und Parallelproben der Kulturüberstände (Ü) der Stämme DB104/pJM10/pWH1520 (+ Kontrollplasmid) und DB104/pJM10/pWHsecB (+ SecB induzierbar) nach dreistündiger Induktion des SecB - Proteins (+) bzw. ohne Zusatz des Induktors Xylose (-).

Die Größe des in *B.subtilis* synthetisierten SecB - Proteins wurde durch SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese zu 16 kDa bestimmt. Dies entspricht dem Molekulargewicht, welches für das im homologen Organismus exprimierten *E.coli* SecB - Proteins ermittelt wurde. Das *E.coli* SecB - Protein scheint demnach in *B.subtilis* stabil zu sein und keinem Abbau zu unterliegen.

Um den Einfluß der SecB Expression auf den Lipaseexport bestimmen zu können, wurden die entsprechenden Proben der Zellextrakte und der Kulturüberstände mit Lipase - spezifischem Antiserum geblottet (Abb. 14): In den Zellextraktproben des Kontrollstammes waren unabhängig von der Xylose - Zugabe die akkumulierte, 94 kDa große Präprolipase, sowie zahlreiche Abbauprodukte des Lipasevorläufers nachweisbar. Nur ein Teil der gesamten Lipase wurde exportiert und als reife Lipase mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa im Überstand detektiert. Diese Verteilung wurde im Kontrollstamm durch den Induktor Xylose nicht beeinflusst. In dem Stamm DB104/pJM10/pWHsecB wurde eine identische Verteilung von unprozessierter Präprolipase und reifer exportierter Lipase gefunden, unabhängig von der durch Xylose induzierten SecB Expression. Die Expression des heterologen Export - spezifischen *E.coli* Chaperons SecB hat daher keinen Einfluß auf die Effizienz des Proteinexports in *B.subtilis* unter Überproduktionsbedingungen.

### 3.3 Isolierung *prsA* - homologer Gene aus *B.licheniformis*

Das vermutlich an einem späten Schritt der Proteintranslokation beteiligte PrsA - Protein wurde bisher nur in *B.subtilis* identifiziert (Kontinen et al., 1991). Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob das PrsA - Protein eine Spezialisierung im Proteinexport von *B.subtilis* ist oder auch in weiteren Gram - positiven Organismen verbreitet ist, sollte ein Homologes des *B.subtilis prsA* - Gens in dem Gram - positiven Bakterium *B.licheniformis* identifiziert und anschließend isoliert werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob möglicherweise eine ein *prsA* - homologes Gen betreffende Mutation die Ursache für die erhöhte Produktivität des industriellen *B.licheniformis* - Subtilisinproduzenten P300 sein könnte. Um zu untersuchen, ob eine derartige Mutation vorliegt, wurden daher *prsA* - homologe Gene sowohl aus dem *B.licheniformis* Wildtyp DSM13 als auch aus dem Produktionsstamm P300 isoliert und miteinander verglichen.

### 3.3.1 Hybridisierung chromosomaler DNA aus *B.licheniformis* mit einer *prsA* - Gensonde aus *B. subtilis*

Zur Identifizierung *prsA* - homologer Gene in dem *B.licheniformis* Wildtypstamm DSM13 und dem *B.licheniformis* Produktionsstamm P300 wurde die chromosomale DNA dieser Organismen mit einer *prsA* - Sonde aus *B.subtilis* in einem "Southern" - Blot hybridisiert. Als Vergleich wurde ebenfalls die chromosomale DNA des Gram - negativen *Escherichia coli* Stammes JM109 herangezogen. Die aus den verschiedenen Bakterienstämmen isolierte (2.6.5) und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* bzw. *HpaI* geschnittene (2.6.1) DNA wurde aufgetrennt und mit der Digoxigenin - markierten *B.subtilis prsA* - Gensonde hybridisiert (2.6.6). Die Hybridisierungsreaktionen wurden unter stringenten (30% Formamid), sowie unter erniedrigten Stringenzbedingungen (15% Formamid) durchgeführt. Wie Abb. 15 zeigt, lieferte die Hybridisierung der Sonde mit der homologen, aus *B.subtilis* isolierten DNA erwartungsgemäß unter erniedrigten Stringenzbedingungen deutliche Signale. Diese wurden auf einem etwa 20 kb großen *HpaI* -, einem 2,4 kb großen *HindIII* - bzw. einem 10 bis 11 kb großen *EcoRI* - Fragment lokalisiert. Bei der Hybridisierung der chromosomalen DNA aus *E.coli* wurden hingegen keine Signale erhalten. Dies ist ein Hinweis darauf, daß in *E.coli* tatsächlich kein *prsA* - homologes Gen existiert und schließt unter den gewählten Bedingungen gleichzeitig unspezifische Hybridisierungen mit der verwendeten Gensonde aus. Spezifische Signale wurden hingegen mit der chromosomalen DNA aus dem *B.licheniformis* - Stamm DSM13 erhalten: Hybridisierende Bereiche sind auf einem etwa 20 kb großen *HpaI* -, einem 2,7 kb großen *HindIII* - bzw. auf einem 3,6 kb großen *EcoRI* - Fragment lokalisiert. Die mit der chromosomalen DNA aus *B.subtilis* bzw. *B.licheniformis* bei 15% Formamid erhaltenen spezifischen Signale wurden auch unter stringenten Bedingungen von 30% Formamid erhalten.

### 3.3.2 Klonierung und Sequenzierung eines *prsA* - homologen Gens aus dem *B.licheniformis* Wildtyp DSM13

Für die Klonierung des hybridisierenden DNA - Fragments wurden partielle Genbanken der mit *HindIII* (2,5 - 3,0 kb) bzw. *EcoRI* (3,2 - 3,8 kb) geschnittenen chromosomalen *B.licheniformis* DNA in dem *E.coli* Vektor pHSG576 angelegt. Im Fall der mit *EcoRI* geschnittenen DNA wurden Insert - haltige Plasmide von 60 Transformanten isoliert und durch erneute Hybridisierung auf Insertion des *prsA* - homologen Gens untersucht. Bei einem der Transformanten konnte so die erfolgreiche Klonierung des zu isolierenden 3,6 kb großen chromosomalen *EcoRI* - Fragments aus *B.licheniformis* DSM13 nachgewiesen werden. Das entsprechende Plasmid pDSM1 (Abb. 16) wurde im folgenden weiter charakterisiert. Für die Subklonierung des zu sequenzierenden *prsA* - homologen Gens wurde das 3,6 kb große *EcoRI* - Fragment genauer untersucht. Das Plasmid pDSM1 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und die entstandenen Fragmente durch Hybridisierung mit der *B.subtilis prsA* - Sonde charakterisiert. Bei den kleinsten Vektor - Fragmenten, auf welchen ein *prsA* - Homolo-

ges lokalisiert war, handelte es sich um ein 1,8 kb großes *PvuII* - bzw. 2,4 kb großes *HindIII*-Fragment. Diese wurden isoliert und in die mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisierten Vektoren pUC18 oder pHSG576 kloniert. Die so konstruierten Plasmide pDSM2 und pDSM3 (Abb. 16) wurden mit den universellen Primern des M13/pUC - Systems sequenziert.

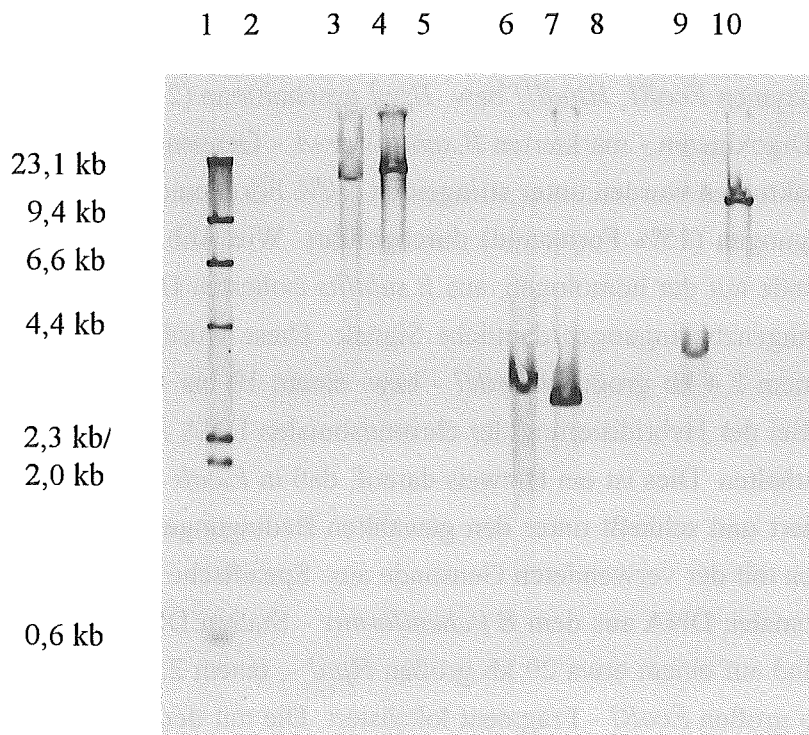


Abb. 15: "Southern" Hybridisierung chromosomaler DNA mit der *prsA* - Sonde aus *B.subtilis* unter erniedrigten Stringenzbedingungen von 15% Formamid. Längenstandard Lambda - DNA \* *HindIII* (1), chromosomale DNA aus *E.coli* JM109 \* *HpaI* (2), *B.licheniformis* DSM13 \* *HpaI* (3), *B.subtilis* DB104 \* *HpaI* (4), *E.coli* JM109 \* *HindIII* (5), *B.licheniformis* DSM13 \* *HindIII* (6), *B.subtilis* DB104 \* *HindIII* (7), *E.coli* JM109 \* *EcoRI* (8), *B.licheniformis* DSM13 \* *EcoRI* (9), *B.subtilis* DB104 \* *EcoRI* (10)

Die Sequenzdaten wurden ausgewertet und mittels Computeranalyse mit den in der Datenbank (HUSAR, Heidelberg) gespeicherten Sequenzen verglichen um einmal festzustellen, ob auf dem hybridisierenden Fragment tatsächlich ein *prsA* - homologes Gen aus *B.licheniformis* lokalisiert ist und um weiterhin die Lage und die Orientierung des Gens auf dem subklonierten Fragment bestimmen zu können. Es zeigte sich, daß weder die DNA im Randbereich des *EcoRI* - Fragments, noch die vor der *PvuII* - Schnittstelle (b) bestimmte DNA - Sequenz für einen möglichen offenen Leserahmen kodiert. Auf DNA - Ebene wurde auch keine signifikante Homologie mit den Sequenzen der Datenbank gefunden. Die stromabwärts der *PvuII* - Schnittstelle (a) ermittelte Sequenz hingegen kodiert für einen durchgehenden Leserahmen, der signifikante Homologie zu dem PrsA - Protein von *B.subtilis* zeigt. Weiterhin zeigte die Com-

puteranalyse, daß dieser Teil dem für den extremen Carboxyterminus kodierenden Bereich des PrsA - Homologen von *B.licheniformis* entspricht. Der offener Leserahmen geht über die zur Subklonierung verwendete *PvuII* - Schnittstelle (a) hinaus, d.h. auf dem *PvuII* - Fragment ist nicht das vollständige *prsA* - Gen lokalisiert. Zur Sequenzierung des für den Carboxyterminus kodierenden Bereiches und des nichtkodierenden 3' - Endes wurde der zu der bereits bestimmten Sequenz homologe Primer Bli4 unter Verwendung des Plasmids pDSM3 als Template benutzt. Unter Ausnutzung einer in der *B.licheniformis prsA* - Teilsequenz identifizierten singulären *Cfr10I* - Restriktionsschnittstelle wurde zur Sequenzierung des 5' - Bereiches ein 1.0 kb großes *EcoRI/Cfr10I* - Fragment des Plasmids pDSM1 in den mit *EcoRI/XmaI* geschnittenen Vektor pUC19 inseriert. Die Sequenzierung des so konstruierten Plasmids pDSM4 mit den universellen Primern des M13/pUC - Systems lieferte einen Teil der 5' - *prsA* - Sequenz. Durch die schrittweise Verwendung der spezifischen Oligonukleotide Bli3 und Bli2, welche jeweils zu neusequenzierten DNA - Bereichen homolog waren, konnte schließlich die Sequenz des gesamten *B.licheniformis prsA* - Gens und des nichtkodierenden 5' - Bereiches bestimmt werden.

### 3.3.3 Analyse der Sequenzdaten und Vergleich des *prsA* - homologen Gens aus *B.licheniformis* mit dem *B.subtilis prsA* - Gen

Auf dem aus dem *B.licheniformis* Wildtyp DSM13 isolierten 3,6 kb großen chromosomalen *EcoRI* - Fragment wurde ein 758 Bp umfassender offener Leserahmen identifiziert (Abb. 17). Die Sequenzanalyse der 5' flankierenden Region zeigt, daß 9 Nukleotide vor dem ATG - Startkodon eine potentielle Ribosomenbindungsstelle der Sequenz A G G A G T G<sub>(100 - 106)</sub> liegt (Shine u. Dalgarno, 1974), welche in fünf Positionen einer für *B.subtilis* angegebenen starken Shine - Dalgarno - Sequenz entspricht (Farwell et al., 1992) und mit der für das *B.subtilis prsA* - Gen angegebenen Ribosomenbindungsstelle (Kontinen et al., 1991) übereinstimmt. In Anlehnung an die Konsensus - Sequenz T A T A A T eines vegetativen *B.subtilis* Promotors (Moran et al., 1982) könnte die Sequenz T T T A A A<sub>(83 - 88)</sub> eine potentielle -10 Region und in einem Abstand von 15 Nukleotiden oder 20 Nukleotiden die Sequenz A T G A T A<sub>(57 - 62 oder 62 - 67)</sub>, (Konsensus: T T G A C A) eine potentielle -35 Region eines *Bacillus* - Promotors darstellen. Stromabwärts des Stopkodons T G A könnte ein 13 Bp langer "inverted - repeat" von der Position 981 - 994 und 1010 - 1023 für eine rho - unabhängige Transkriptions - Termination sorgen. Die Translation der ermittelten Sequenz zeigt, daß es sich bei dem PrsA - Homologen von *B.licheniformis* um ein Protein aus 286 Aminosäuren mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 32 kDa handelt. Den Aminoterminus bildet ein 19 Aminosäuren langes Signalpeptid mit einem positiv - geladenen extremen Aminoterminus (Met - Lys<sup>+</sup> - Lys<sup>+</sup>), einem hydrophoben Segment von 13 Aminosäuren und einer durch die Lipoprotein - Signalpeptidase erkannten Konsensussequenz von Leu - Ser - Ala/ Cys - Ser - Gly. Nach Hydrophobizitätsanalysen besitzt das reife Protein keine Transmembrandomäne und nimmt zu 77% eine überwiegend  $\alpha$  - helikale Konformation an (Garnier et al., 1978).

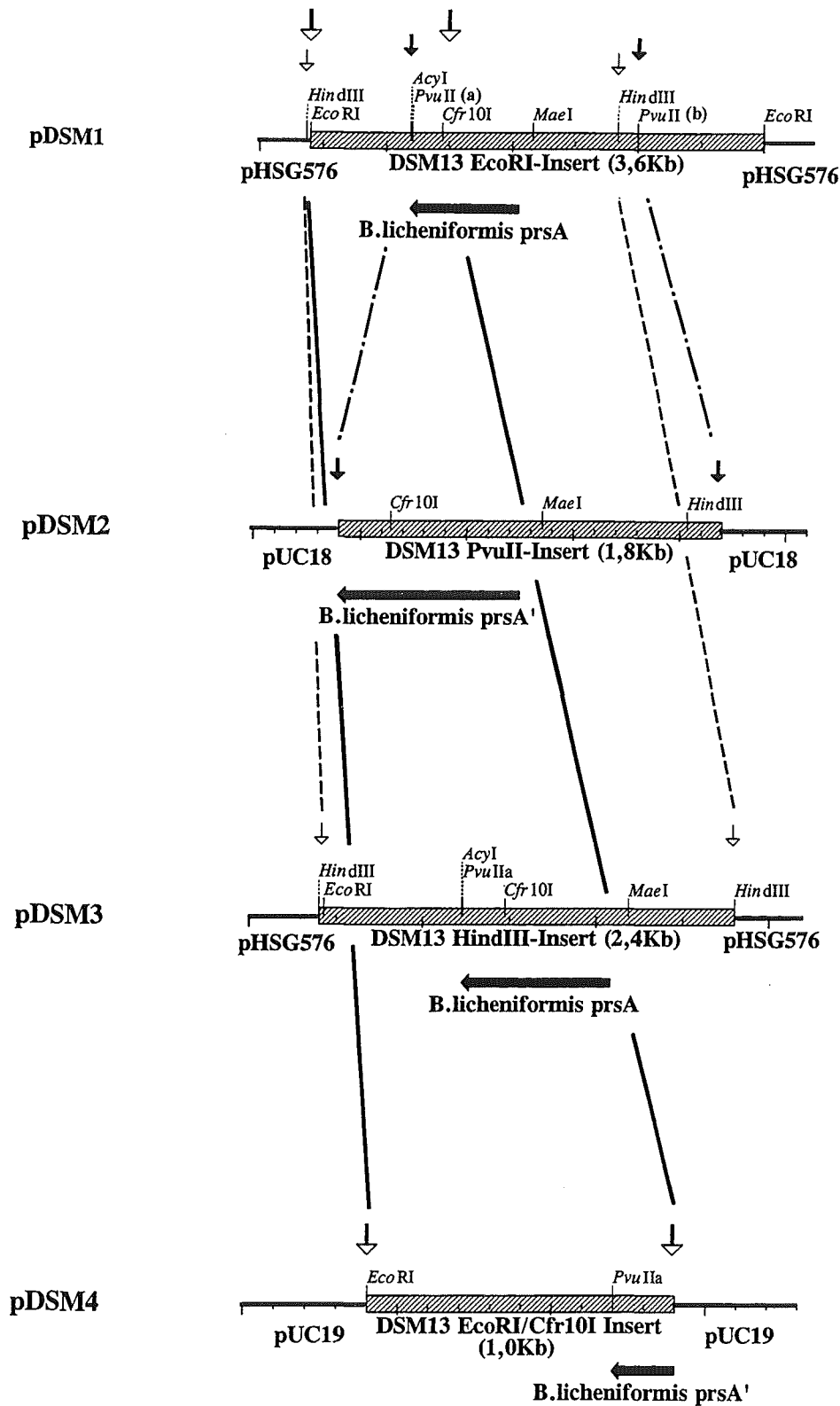


Abb.16: Subklonierung des in dem Plasmid pHSG576 klonierten 3,6 kb großen chromosomalen *EcoRI* - Fragments aus *B.licheniformis* DSM13. Die Vektorbereiche sind schematisch als schwarze Linien, die subklonierte DNA aus *B.licheniformis* als schraffierte Balken dargestellt.

10 *MaeI* 20 30 40 50  
 AAATTTGACT AGACGGATGC CCCTCTGTTG AAAATCTTTT TACAGCATGT  
 Bli1 →

60 70 80 90 100  
 CAGAATATGA TATGATACAA TTCAAAGGAA AGTTTAAACT GTTATGATTA  
 -35 Region -10 Region

110 120 130 140 150  
 GGAGTGTTTG CATTTATGAA GAAGATTGCA ATTGCGGCGA TTACAGCGAC  
 RBS M K K I A I A A I T A T

160 170 180 190 200  
 AAGCGTGCTG GCTCTCAGCG CATGCAGCGG GGGAGATTCT GAGGTTGTTG  
 S V L A L S A C S G G D S E V V

210 220 230 240 250  
 CGGAAACAAA AGCTGGAAAT ATTACAAAAG AAGACCTTTA TCAAACATTA  
 A E T K A G N I T K E D L Y Q T L

260 270 280 290 300  
 AAAGACAATG CCGGAGCGGA CGCACTGAAC ATGCTTGTTT AGCAAAAAGT  
 K D N A G A D A L N M L V Q Q K V

310 320 330 340 350  
 ACTCGATGAT AAATACGATG TCTCCGACAA AGAAATCGAC AAAAAGCTGA  
 L D D K Y D V S D K E I D K K L  
 ← Bli2

360 370 380 390 400  
 ACGAGTACAA AAAATCAATG GGTGACCAGC TCAACCAGCT CATTGACCAA  
 N E Y K K S M G D Q L N Q L I D Q

410 420 430 440 450  
 AAAGGCGAAG ACTTCGTCAA AGAACAGATC AAATACGAAC TTCTGATGCA  
 K G E D F V K E Q I K Y E L L M Q

460 470 480 490 500  
 AAAAGCCGCA AAGGATAACA TAAAAGTAAC CGATGATGAC GTAAAAGAAT  
 K A A K D N I K V T D D D V K E

510 520 530 540 550  
 ATTATGACGG CCTGAAAGGC AAAATCCACT TAAGCCACAT TCTTGTGAAA  
 Y Y D G L K G K I H L S H I L V K

560 570 580 590 600  
 GAAAAGAAAA CGGCTGAAGA AGTTGAGAAA AAGCTGAAAA AAGGCGAAAA  
 E K K T A E E V E K K L K K G E K

610 620 630 640 650  
 ATTCGAAGAC CTTGCAAAAG AGTATTCAAC TGACGGTACA GCCGAAAAAG  
 F E D L A K E Y S T D G T A E K  
 ← Bli3

660 670 680 690 700  
 GCGGCGACCT CGGCTGGGTC GGCAAAGACG ATAACATGGA CAAGGATTTC  
 G G D L G W V G K D D N M D K D F

```

      710      720      730      740      750
GTCAAAGCGG CATTGCTTT GAAAACCGGC GAAATCAGCG GACCTGTGAA
  V  K  A  A  F  A  L  K  T  G  E  I  S  G  P  V  K
      760      770      780      790      800
ATCCCAATTC GGCTATCACA TCATTAAAAA AGACGAAGAA CGCGGCAAAT
  S  Q  F  G  Y  H  I  I  K  K  D  E  E  R  G  K
      810      820      830      840      850
ATGAAGACAT GAAAAAAGAG CTTAAAAAAG AAGTCCAAGA ACAAAGCAA
Y  E  D  M  K  K  E  L  K  K  E  V  Q  E  Q  K  Q
      860      870      880      890      900
AATGATCAAA CTGAACTGCA ATCCGTCATT GACAAACTTG TCAAAGATGC
  N  D  Q  T  E  L  Q  S  V  I  D  K  L  V  K  D  A
                                   Bli4
      910      920      930      940      950
TGATTTAAAA GTAAAAGACA AAGAGTTGAA AAAACAAGTC GACCAGCGTC
  D  L  K  V  K  D  K  E  L  K  K  Q  V  D  Q  R
→                                     ← Bli5
      960      970      980      990      1000
AAGCTCAGAC AAGCAGCAGC AGCTGACGCC AAAAAAGCTG TCCTCCCCTC
Q  A  Q  T  S  S  S  S  AcYI
      1010      1020      1030      1040      1050
GTTGGGGTCG GACAGCTTTT TTTATGCGAT GGAATGGCTG TCAGCCGATT
←
      1060      1070      1080      1090      1100
TTTCATGCTG TTCTTGATCT TCATCCAGTG TACGCTTCAT GCGCTTTGCT
      1110      1120      1130      1140      1150
TTTTCTTTTT CCATCCGTTC GATATAAATG CGGCCTTCTT TTTCGATAAA
      1160      1170      1180      1190      1200
AGCCTGGTCA ATCTTTTCCT CTCCTTAGA CCGTCGTCA TCAGCTTATA
      1210      1220      1230      1240      1250
GGCGCTGAAA ATAATGCCGA CGATGCAAAG GTACACCCAC CACGGAAACA
← Bli6
GCAGCA

```

Abb. 17 : Nukleotidsequenz des *prsA* - homologen Gens aus *B.licheniformis* DSM13 sowie der angrenzenden nicht - kodierenden 5' - und 3' - gelegenen Sequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenz des *prsA* - Leserahmens. Vermutete Promotor - Sequenzen sind unterstrichen und mit -35 Region bzw. -10 Region, die potentielle Ribosomenbindungsstelle mit RBS gekennzeichnet. Start - und Stopkodon des *prsA* - Gens sind fett gedruckt, die Positionen des potentiellen Terminators sowie der verwendeten spezifischen Oligonukleotide sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Positionen der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *MaeI* und *AcyI*, welche zur Klonierung des *prsA* - Gens aus dem Subtilisinproduktionsstamm P300 verwendet wurden, sind kursiv gedruckt.



Der Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den in der Swiss - Protein - Datenbank (HUSAR, Heidelberg) gespeicherten Proteinsequenzen zeigte, daß die größte Ähnlichkeit tatsächlich zu dem PrsA - Protein von *B.subtilis* besteht. Beide Proteine besitzen zu 69% identische Aminosäuren. Der Anteil von Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften beträgt 10%, woraus sich insgesamt eine Homologie von 79% ergibt. Das aus *B.licheniformis* isolierte Gen kodiert demnach sehr wahrscheinlich für ein extracytoplasmatisches Lipoprotein, welches ein Homologes des *B.subtilis* PrsA - Proteins darstellt.

BS	-	MKKIAIAAITATSILALSACSSGDKEVIAKTDAGDVTKGELYTNMKKTAG	-50
BLI	-	MKKIAIAAITATSVLALSACSGDSEVVAETKAGNITKEDLYQTLKDNG	-50
BS	-	ASVLTQLVQEKVLDKKYKVSDEIDNKLKEYKTQLGDQYTALEKQYQKDY	-100
BLI	-	ADALNMLVQQKVLDDKYDVSDKEIDKKLNEYKKSMDQQLNQLIDQKGEDF	-100
BS	-	LKEQVKYELLTQKAAKDNIKVTDAIDKEYWGLKKGKIRASHILVADKKTA	-150
BLI	-	VKEQIKYELLMQKAAKDNIKVTDDDVKEYYDGLKKGKIHLSHILVKEKKTA	-150
BS	-	EEVEKKLKKGEKFEDLAKEYSTDSSASKGGDLGWFAKEGQMDTFSKAAF	-200
BLI	-	EEVEKKLKKGEKFEDLAKEYSTDGTAEKGGDLGWVGKDDNMDKDFVKAFF	-200
BS	-	KLKTGEVSDPVKTQYGYHIIKKTEERGKYDDMKKELKSEVLEQKLNDNAA	-250
BLI	-	ALKTGEISGPVKSQFGYHIIKKDEERGKYEDMKKELKKEVQEQKQNDQTE	-250
BS	-	VQEAVQKVMKKADIEVKDKDLKDTFNTSSTSNTSSSSSSNSK	-292
BLI	-	LQSVIDKLVDADLKVDKELKKQVDQRQA--QTSSSS	-286

Abb. 18: Aminosäurevergleich der PrsA - Proteine aus *B.subtilis* (BS) und *B.licheniformis* DSM13 (BLI). Identische Aminosäuren sind mit "|" markiert, Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften wie A, S, T; D, E; N,Q; R, K; I, L, M, V; F, Y, W sind mit "." markiert.

### 3.3.4 Klonierung und Sequenzierung eines *prsA* - homologen Gens aus dem *B.licheniformis* Subtilisinproduktionsstamm P300

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob möglicherweise eine Mutation im *prsA* - Gen für eine gegenüber dem Wildtyp DSM13 erhöhte Subtilisinproduktivität des industriell genutzten *B.licheniformis* Stamm P300 verantwortlich ist, sollten die *prsA* - Gene beider Stämme miteinander verglichen werden. Die Klonierung und Sequenzierung des *prsA* - homologen Gens aus

dem *B.licheniformis* Wildtyp wurde im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Wie bei dem Wildtyp - Stamm konnte durch die Hybridisierung der aus dem Produktionsstamm P300 isolierten chromosomalen DNA mit der *B.subtilis prsA* - Gensonde ebenfalls ein *prsA* - homologes Gen auf einem 3,6 kb großen EcoRI - bzw. einem 2,7 kb HindIII - Fragment identifiziert werden. Da die Sequenz des Wildtyp - *prsA* - Gens inklusive der flankierenden 5' und 3' - Bereiche ermittelt worden war, wurde das *prsA* - homologe Gen des Stammes P300 mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide und der aus dem Stamm P300 isolierten chromosomalen DNA als Template isoliert (2.6.3). Die Positionen dieser Oligonukleotide (Bli1 und Bli6) wurden so gewählt, daß das gesamte *prsA* -homologe Strukturgen mit den flankierenden 5' und 3' - Sequenzen als 1245 Bp großes Fragment amplifiziert wurde (Abb. 17, Abb.19).

Das PCR - Produkt wurde gereinigt (2.6.4) und anschließend mit den Restriktionsenzymen *MaeI* und *AcyI* geschnitten (Abb. 17). Die Spaltprodukte wurden durch Agarose - Gelelektrophorese (2.6.1) getrennt und das 967 Bp große *MaeI/AcyI* - Fragment aus dem Gel isoliert. Der Vektor pUC18 wurde mit dem Restriktionsenzym *AccI* innerhalb und mit *NdeI* außerhalb der MCS geschnitten. Der 2452 Bp große Vektoranteil wurde anschließend isoliert (2.6.1) und mit dem *MaeI/AcyI* - PCR - Fragment ligiert (Abb. 19). Der *E.coli* Stamm JM109 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Durch die Restriktionsanalyse der aus mehreren Transformatanten isolierten Plasmide konnte die erfolgreiche Insertion des PCR - Fragments nachgewiesen werden. Das so konstruierte Plasmid pP300 wurde im präparativen Maßstab isoliert und mit dem universellen Reverse Primer des M13/pUC - Systems, sowie mit den spezifischen Oligonukleotiden Bli2, Bli3 und Bli4 sequenziert. Da in dem Plasmid pP300 die zu dem universellen Sequenz - Primer homologe Sequenz fehlt, mußte zur Bestimmung der carboxyterminalen Sequenz mit dem Oligonukleotid Bli5 ein weiteres spezifisches Oligonukleotid eingesetzt werden. Die zur Klonierung des PCR - Produktes benutzte *AcyI* - Schnittstelle liegt unmittelbar im *prsA* - Stopkodon, so daß der 3' - nicht - kodierende Bereich nicht kloniert wurde. Zur Bestimmung der Sequenz dieses Bereiches wurden die aufgereinigten PCR - Produkte direkt als Template in den mit den spezifischen Oligonukleotide Bli4 und Bli6 durchgeführten Sequenzreaktionen eingesetzt (Abb. 17). Die durch den Sequenzvergleich des DSM13 - mit der P300 - *prsA* - Gen möglicherweise ermittelten Mutationen könnten auf die fehlerhafte Aktivität der Taq - DNA - Polymerase in der PCR zurückgeführt werden und somit keine durch Mutagenese des Stammes P300 entstandene chromosomale Veränderung darstellen. Um die Fehlinterpretation eventuell identifizierter Mutationen auszuschließen, wurde die Sequenz von mindestens zwei, in voneinander unabhängigen Reaktionen synthetisierten, PCR - Produkten bestimmt. Der Sequenzvergleich zeigte jedoch, daß weder das *prsA* - Strukturgen des Produktionsstammes P300, noch der die Promotorregion umfassende angrenzende 5' - nicht - kodierende Bereich (Nukleotid 10 - 115, Abb. 17) eine Mutation trägt. In dem 3' - nicht - kodierenden Bereich mit dem vermuteten Terminator wurde ebenfalls keine Abweichung von der Wildtypsequenz identifiziert (Nukleotid 976 - 1185).

Es konnte somit gezeigt werden, daß keine das *prsA* - Gen direkt betreffende Mutation für die erhöhte Produktivität des *B.licheniformis* - Stammes P300 verantwortlich ist.

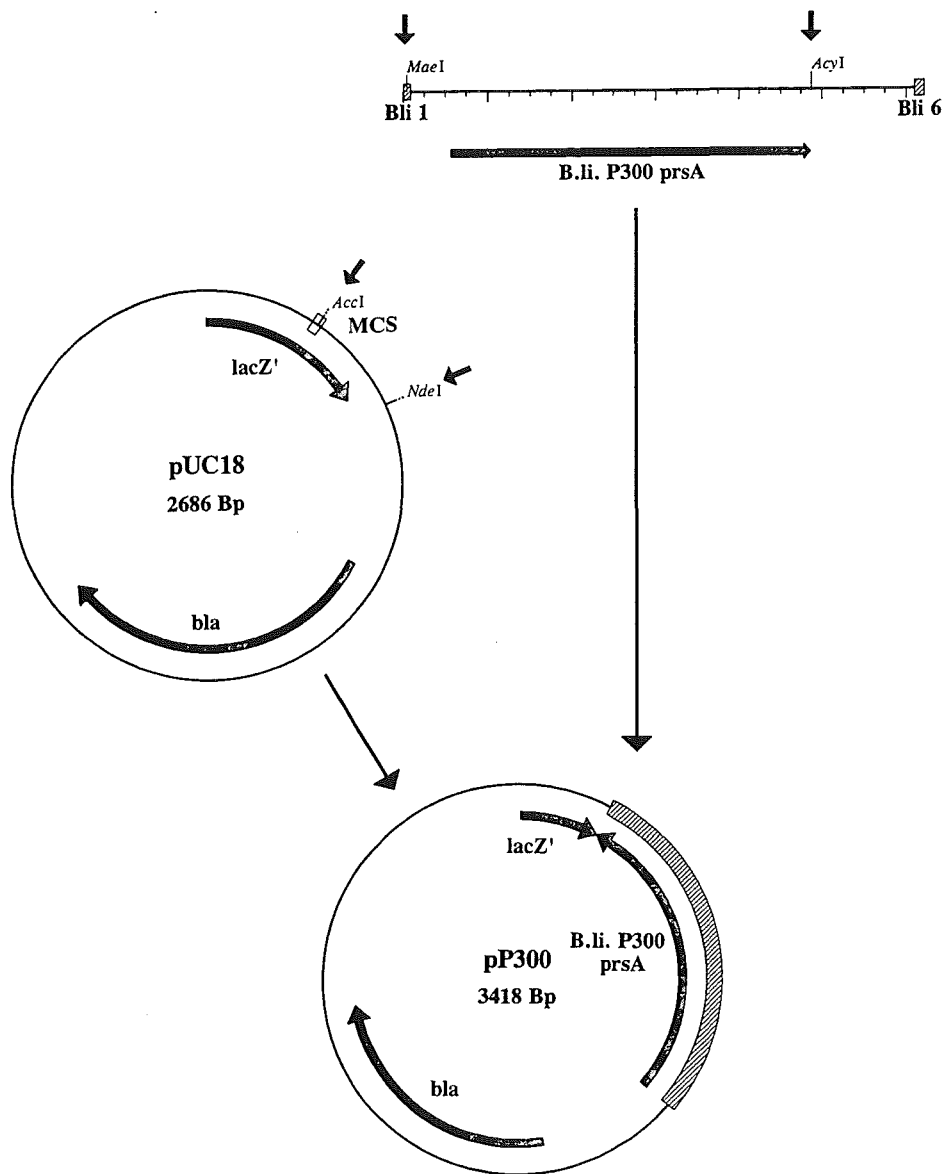


Abb. 19: **Konstruktion des Plasmids pP300** zur Sequenzierung des *prsA* - Gens aus dem *B.licheniformis* - Stamm P300 (*B.li. P300 prsA*), *bla* =  $\beta$  - Laktamasesgen, *lacZ'* =  $\beta$  - Galactosidasegen ( $\alpha$  - Peptid - kodierender Bereich), *Bli 1*, *Bli 6* = spez. Oligonukleotide, MCS = Multiple - Klonierungsstelle

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluß einer erhöhten zellulären Konzentration der Exportkomponente SecA bzw. SecB auf die Proteinsekretion in *E.coli* und *B.subtilis* unter Überproduktionsbedingungen

Um bei einer biotechnologischen Produktion sekretierbarer Proteine eine möglichst große Ausbeute erzielen zu können, werden diese Proteine häufig überproduziert. Diese Überproduktion kann zu einer Überlastung der zellulären Sekretionskapazität und somit zu einer intrazellulären Vorläuferakkumulation führen (Freudl, 1992; Sibakov et al., 1984; Ulmanen et al., 1985). In diesen Fällen wird zum einen die Ausbeute an sekretiertem Protein um den Anteil des nicht exportierten Vorläufers vermindert, zum anderen kann die Überproduktion sogar zum Absterben der Zellen führen (Freudl et al., 1986). Unter Überproduktionsbedingungen könnte zum Einen die Menge eines mit den Vorläuferproteinen wechselwirkenden Chaperons den Proteinexport dadurch limitieren, daß nur ein Teil des synthetisierten Vorläufers exportkompetent gehalten wird, während der andere Teil in eine exportinkompetente Konformation faltet. Andererseits könnte die zelluläre Sekretionskapazität unter diesen Bedingungen auch durch die Verfügbarkeit der peripheren Translokatorkomponente SecA bzw. der zentralen Bestandteile des integralen Translokatorkomplexes SecE, SecY oder SecG begrenzt sein. Darüberhinaus könnten die vermutlich an der Freisetzung der reifen Proteine von der Cytoplasmamembran beteiligten Proteine SecD und SecF ebenfalls limitierend sein. Die Überlegung, daß der Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen möglicherweise durch die Überexpression der an dem limitierenden Schritt beteiligten Exportkomponenten (Sec - Proteine) verbessert werden kann, führte zu dem in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatz: Es wurde untersucht, ob der Proteinexport in *E.coli* und *B.subtilis* unter Überproduktionsbedingungen durch die zelluläre Konzentration der zentralen Exportkomponente SecA bzw. des Export - spezifischen Chaperons SecB limitiert ist. Hierfür wurde der Einfluß der Überexpression dieser Exportkomponenten auf den Export eines überproduzierten sekretorischen Modellproteins bestimmt.

#### 4.1.1 Erhöhung der zellulären SecA - bzw. SecB - Proteinkonzentration in *E.coli* und *B.subtilis*

Zur Untersuchung des Proteinexports wurden die jeweils homologen SecA - Proteine in *E.coli* bzw. *B.subtilis* überexprimiert. Mit Hilfe SecA - spezifischer Antikörper wurde nachgewiesen, daß diese Überexpression in beiden Organismen tatsächlich zu einer starken Erhöhung der zellulären Konzentration der zentralen Exportkomponente SecA führte, obwohl die SecA - Synthese in *E.coli* reguliert wird: Das *E.coli* *secA* - Gen ist mit dem *GenX* in einem Operon organisiert und wird durch einen vor dem *GenX* gelegenen Promotor transkribiert (Schmidt et al., 1988 u. 1991). Unter normalen Exportbedingungen wird die SecA - Expression in *E.coli* durch die Bindung des SecA - Proteins an seine eigene mRNA z.T. reprimiert (Schmidt u.

Oliver, 1989). Die Bindung erfolgt sehr wahrscheinlich an dem mRNA - Abschnitt, welcher dem intergenischen Bereich zwischen dem *GenX* und dem *secA* - Gen entspricht (Schmidt et al., 1991). Nach Literaturangaben steigt die zelluläre SecA - Konzentration um das 10 - 20 fache, wenn durch die Expression Export - defekter Hybridproteine oder bei der nicht - permissiven Temperatur in konditional - letalen *secA*, *secD* bzw. *secY* - Mutanten Vorläuferproteine akkumulieren und Störungen am Translokator auftreten ( Oliver u. Beckwith 1982; Rollo u. Oliver, 1988). Wie die Untersuchung von SecB - Nullmutanten zeigte, reicht eine durch Exportstreß hervorgerufene Vorläuferakkumulation alleine nicht aus, die SecA - Synthese zu dereprimieren (Rollo u. Oliver, 1988). Das eigentliche Signal, welches in *E.coli* zu einer Derepression der SecA - Synthese führt, ist bislang noch nicht bekannt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zum Proteinexport in *E.coli* zeigten, daß die ausschließlich chromosomal - kodierte SecA - Menge des verwendeten *E.coli* Kontrollstammes trotz der zu einer massiven Vorläuferakkumulation führenden, induzierten OmpA\* - Überproduktion nicht beeinflußt wurde. Der Exportapparat von *E.coli* wurde zwar durch die starke OmpA\* - Expression überlastet, was jedoch keine Derepression der SecA - Synthese zur Folge hatte. Die SecA - Proteinmenge des Kontrollstammes entsprach daher der durch Autoregulation niedrigen SecA - Konzentration des *E.coli* Wildtyps.

Im Fall von *E.coli* wurde die SecA - Menge durch das Einführen von auf dem Plasmid pMF8 lokalisierten Kopien des *secA* - Gens ungefähr verdoppelt. Die Synthese des Plasmid - kodierten SecA - Proteins wurde im Fall des Plasmids pMF8, ebenso wie das chromosomal - kodierte SecA - Protein in *E.coli*, autoreguliert, da das *GenX* bzw. der intergenische Bereich zwischen dem *GenX* und dem *secA* - Gen ebenfalls auf diesem Plasmid lokalisiert ist (Schmidt u. Oliver, 1989). Trotz dieser Regulation wies der das Plasmid pMF8 enthaltende *E.coli* Stamm wegen des Gen - Dosis - Effekts eine gegenüber dem Kontrollstamm ca. zweifach erhöhte zelluläre SecA - Menge auf. Nach Schmidt u. Oliver (1989) exprimiert der ebenfalls das Plasmid pMF8 enthaltende *E.coli* Stamm MM18, ein Derivat des hier verwendeten Stammes MC4100, hingegen unter normalen Exportbedingungen eine gegenüber dem Kontrollstamm etwa neunfach erhöhte SecA - Menge. Durch die Anwesenheit eines zweiten, zur induzierbaren OmpA\* - Überproduktion eingesetzten, Plasmids (pEF3S1/-S3) könnte die Kopienzahl des Plasmids pMF8 und dadurch die Zahl der *secA* - Genkopien in dem in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Stamm vermindert worden sein, so daß hier eine nur etwa zweifach erhöhte zelluläre SecA - Menge erzielt wurde.

Zur Untersuchung des Proteinexports in *B.subtilis* wurde, entsprechend zu den mit *E.coli* durchgeführten Experimenten, die zelluläre Konzentration des homologen SecA - Proteins durch die induzierbare Expression von Plasmid - kodiertem SecA im Vergleich zu der ausschließlich chromosomal - kodierten SecA - Proteinmenge des Kontrollstammes in *B.subtilis* deutlich erhöht. Im Fall von *B.subtilis* führte die Induktion des Plasmid - kodiertem SecA sogar zu einer etwa fünffachen Erhöhung der SecA - Menge.

Im Gegensatz zu dem SecA - Protein unterliegt die Expression des SecB - Proteins in *E.coli* offensichtlich keiner Regulation. Zahlreiche Literaturdaten zeigen, daß die Expression von Plasmid - kodiertem SecB - Protein in *E.coli* zu einer gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhten Menge von stabilem SecB - Protein führt (Kumamoto u. Beckwith, 1985; Kumamoto u. Nault, 1989; Weiss et al., 1988). Zur Überexpression des SecB - Proteins in *E.coli* wurden daher Stämme verwendet, die das *secB* - Plasmid pRH407 enthielten.

Da bisher kein SecB - Homologes in Gram - positiven Bakterien identifiziert werden konnte, wurde das heterologe *E.coli* SecB - Protein in *B.subtilis* exprimiert, um den Einfluß eines exportspezifischen Chaperons auf den Proteinexport von *B.subtilis* bestimmen zu können. Mit Hilfe SecB - spezifischer Antikörper wurde nachgewiesen, daß die Expression des Plasmid - kodierten *E.coli* SecB - Proteins in *B.subtilis* zur Synthese von stabilem SecB führt. Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtungen von Collier (1994) bestätigt, der ebenfalls die Expression von stabilem *E.coli* SecB - Proteins in *B.subtilis* beschreibt. Im verwendeten Kontrollstamm waren hingegen keine SecB - spezifischen Signale im "Western Blot" zu beobachten was darauf hindeutet, daß in *B.subtilis* entweder kein SecB - homologes Protein, oder ein SecB mit geringer Homologie zu dem *E.coli* SecB - Protein existiert. Dieser Befund stimmt mit den Daten von de Cock u. Tomassen (1991) bzw. Collier (1994) überein, die mit Hilfe spezifischer SecB - Antikörper ebenfalls kein SecB - Homologes in *Bacillus cereus* bzw. *B.subtilis* nachweisen konnten.

Es war jedoch unklar, ob eine Überproduktion der Sec - Proteine in *E.coli* bzw. *B.subtilis* auch zur Bildung einer erhöhten Menge an funktionellen Exportkomponenten führt. Durch die Wachstumskomplementation von entsprechenden *sec* - Mutanten wurde sowohl für das Plasmid - kodierte SecA - und SecB - Protein in *E.coli*, wie auch für das SecA - Protein in *B.subtilis* nachgewiesen, daß diese Proteine zumindest teilweise in funktioneller Form exprimiert werden konnten. Es konnte jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß ein Teil der überproduzierten Sec - Proteine im Cytoplasma in inaktiver Form vorlag und somit nicht zu einer Erhöhung der zellulären Konzentration an funktioneller Exportkomponente beitrug.

#### **4.1.2 Einfluß einer erhöhten zellulären SecA - bzw. SecB - Konzentration auf den Proteinexport in *E.coli* unter Überproduktionsbedingungen**

Die als Modellproteine verwendeten Signalsequenzmutanten des SecB - abhängig exportierten OmpA - Proteins werden im Gegensatz zu dem gemischt co - und posttranslational exportierten Wildtypprotein ausschließlich posttranslational sekretiert (Freudl et al., 1988). Das periplasmatische Maltosebindepotein (MBP) wird ebenfalls co - und posttranslational exportiert (Mc Farland et al., 1993). Der Export einer ausschließlich posttranslational exportierten MBP - Signalsequenzmutante wird im Gegensatz zu dem Wildtypprotein in SecB - Nullmutanten völlig blockiert (Collier et al., 1988). Dieser Befund zeigt, daß der Export des Vorläufers dieser MBP - Mutante stärker SecB - abhängig ist als der des Wildtyp - MBP. Analog zu dieser MBP - Mutante sollte auch der Export der OmpA - Signalsequenzmutanten stärker von der

Verfügbarkeit des SecB - Proteins oder einer Exportkomponente mit entsprechenden Chaperoneigenschaften abhängig sein, als der Export des OmpA - Wildtypproteins. Aus diesem Grund wurden daher die OmpA - Signalsequenzmutanten als Modellproteine für die Untersuchungen in dieser Arbeit gewählt. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten jedoch, daß der Proteinexport in *E.coli* unter Überproduktionsbedingungen weder durch die zelluläre SecA - Konzentration, noch durch die Menge des SecB - Proteins limitiert ist. Es sind bislang keine vergleichbaren Untersuchungen bekannt, bei denen der Einfluß einer erhöhten SecA - Proteinmenge auf den Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen bestimmt wurde. Mc Farland et al. (1993) beschreiben jedoch den Einfluß einer Duplikation der nahezu gesamten, für das SecA - Protein kodierenden Sequenz, auf den Export von OmpA bzw. MBP. Die erwähnte Duplikation führt zur Synthese eines SecA - SecA - Fusionsproteins. Die Expression des SecA - Fusionsproteins bewirkte in SecB - Nullmutanten eine deutliche Verbesserung des Proteinexports. Im Gegensatz dazu wurde jedoch in SecB - Wildtypstämmen kein Einfluß auf die Effizienz des Exports von OmpA bzw. MBP festgestellt. Es wird diskutiert, daß das SecA - Fusionsprotein im Vergleich zu dem Wildtyp - SecA möglicherweise doppelt so viele potentielle Bindungsstellen für Vorläuferproteine besitzt. Nach der Dimerisierung besäße dieses Fusionsprotein vier potentielle Bindungsstellen und ähnelte somit dem SecB - Protein, für welches eine Tetramere Form angenommen wird (Kumamoto u. Nault, 1989; Watanabe u. Blobel, 1989). Solch eine Eigenschaft könnte die Wechselwirkungen des SecA- Fusionsproteins mit Vorläufern bei Abwesenheit des SecB - Proteins begünstigen, was dann zu einer verbesserten Einschleusung der Vorläufer in den Exportweg führen könnte.

In dieser Arbeit wurde weiterhin gezeigt, daß der Proteinexport durch die Erhöhung der zellulären SecB - Konzentration ebenfalls nicht beeinflußt wird. Da der Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen in *E.coli* somit weder durch die zelluläre Konzentration des SecA - Proteins noch durch die SecB - Proteinmenge limitiert ist, wird die Sekretionskapazität sehr wahrscheinlich durch die Zahl der Translokatoren begrenzt. Für eine gezielte Verbesserung der Exportkapazität ist daher sehr wahrscheinlich die Überproduktion des Translokatorkomplexes, eventuell gemeinsam mit SecA und/oder SecB, zu einer Exportverbesserung notwendig. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Perez - Perez et al. (1994), die in *E.coli* den Export des menschlichen Interleukin - 6 und eines weiteren menschlichen Cytokinins durch die gleichzeitige Überexpression des SecE - Proteins und einer SecY - Mutante (PrlA4) verbessern konnten. Der Export des mit dem OmpA - Signalpeptid synthetisierten heterologen Interleukin - 6 wurde jedoch nicht durch die Überproduktion des SecE - Proteins gemeinsam mit dem Wildtyp - SecY - Protein beeinflußt. Das *prlA4* - Allel war bisher nur als ein effektiver Suppressor von Signalpeptid - Mutanten bekannt (Emr u. Bassford 1982). Der Einfluß auf den Export des heterologen Interleukins weist darauf hin, daß die PrlA4/SecE - Überproduktion zur verstärkten Bildung von strukturell veränderten Translokatoren führt, welche offensichtlich im Gegensatz zu Translokatoren mit Wildtyp - SecY den Export sekretorischer Proteine signifikant verbessern. Obwohl, nur für die Überexpression des PrlA4 - SecY - Proteins gezeigt, könnte die

Überproduktion der integralen Translokatorkomponenten (SecY, E, G) eventuell gemeinsam mit SecA und/oder SecB zu einer Verbesserung des Proteinexports in *E.coli* führen.

#### **4.1.3 Einfluß der erhöhten zellulären SecA - Konzentration bzw. der Expression des *E.coli* - SecB auf den Proteinexport in *B.subtilis* unter Überproduktionsbedingungen**

Die Lipase des Gram - positiven Bakteriums *S. hyicus* wurde für die Untersuchungen zum Proteinexport in Gram - positiven Bakterien als sekretorisches Modellprotein verwendet, da die Überproduktion dieses heterologen Präproenzym in *B.subtilis* zu einer Überlastung der Sekretionskapazität und somit zu einer deutlichen Vorläuferakkumulation führt.

Durch die Erhöhung der zellulären SecA - Konzentration wurde der Proteinexport unter Überproduktionsbedingungen, analog zur Situation bei *E.coli*, in *B.subtilis* nicht verbessert. Es wurde daher untersucht, ob die Expression des SecB - Proteins aus *E.coli* den Proteinexport in *B.subtilis* beeinflussen kann. Obwohl das heterologe SecB - Protein in *B.subtilis* als stabiles Protein ausgeprägt werden konnte, wurde der Export der Lipase in *B.subtilis* ebenfalls nicht beeinflusst. Dies könnte zum Einen daran liegen, daß die aus dem Gram - positiven Bakterium *S. hyicus* stammende Lipase nicht mit dem *E.coli* SecB - Protein und zum anderen das heterologe SecB nicht mit dem *Bacillus* - Exportapparat wechselwirken kann.

Die Beobachtungen von Collier (1994), daß der posttranslationale Export des heterologen MBP in *B.subtilis* durch die Expression des *E.coli* SecB - Proteins in geringem Maße stimuliert wird, sind ebenfalls kein Nachweis für eine produktive Wechselwirkung des *E.coli* SecB - Proteins mit den *B.subtilis* - Exportkomponenten. Es ist vorstellbar, daß das SecB - Protein in *B.subtilis*, analog zu den Beobachtungen in *E.coli*, nur die Faltung des posttranslational exportierten MBP in eine exportinkompetente Konformation verzögert, wodurch der Export dieser MBP - Proteine ermöglicht wird. Der cotranslationale Export des MBP in *B.subtilis* wird hingegen durch das *E.coli* SecB - Protein sogar verhindert. Die Hemmung des cotranslationalen MBP - Exports könnte auf einer Langlebigkeit der SecB - MBP - Komplexe bzw. einer verzögerten Freisetzung des MBP - Vorläuferproteins von diesem Komplex beruhen. Das MBP ist das bisher einzige Protein, dessen Export in *B.subtilis* durch das *E.coli* SecB - Protein, wenn auch nur in geringem Maße, verbessert werden konnte. Diese Verbesserung beruht sehr wahrscheinlich auf einer nicht - exportspezifischen Chaperoneigenschaft des SecB - Proteins, da der Export des Wildtyp OmpA - Proteins und eines mit einem Gram - positiven Signalpeptid synthetisierten Derivat des MBP in *B.subtilis* durch die Expression des *E.coli* SecB - Proteins nicht beeinflusst wurde, obwohl sowohl das OmpA - Protein als auch das MBP in *E.coli* SecB - abhängig exportiert werden. Vermutlich sind neben der Art des Proteinexports (co - oder posttranslational) vor allem die Protein - spezifischen Faltungseigenschaften der sekretorischen Proteine für die Wechselwirkung mit dem SecB - Protein in *B.subtilis* entscheidend.

In "in vitro" Studien wurde gezeigt, daß das SecB - Protein ein in eine stabile Tertiärstruktur gefaltetes Protein auch dann nicht entfalten kann, wenn das SecB - Protein im Überschuß



zugegeben wurde (Collier et al., 1988). Die Expression des SecB - Proteins hatte daher auch wahrscheinlich "in vivo" keinen Einfluß auf den Export eines sich schnell faltenden Vorläuferproteins, wenn dieses schneller in eine exportinkompetente Konformation faltete als eine Wechselwirkung mit SecB stattfinden konnte. Möglicherweise besitzt die als Modellprotein verwendete Lipase ähnliche Eigenschaften wie das OmpA - Protein oder das mit einem Gram - positiven Signalpeptid synthetisierte Derivat des MBP, deren Export in *B.subtilis* nicht durch das heterologe SecB - Protein stimuliert wurden.

Der Proteinexport von *B.subtilis* ist, analog zur Situation von *E.coli*, offensichtlich weder durch die zelluläre Konzentration des SecA - Proteins, noch durch die Verfügbarkeit des heterologen *E.coli* SecB - Proteins limitiert. Wie bei den Gram - negativen Bakterien scheint daher auch die Sekretionskapazität der Gram - positiven Bakterien sehr wahrscheinlich durch die Zahl der in der Membran liegenden Translokatoren begrenzt zu sein.

## **4.2 Isolierung und Analyse der *prsA* - homologen Gene aus dem *B.licheniformis* Wildtypstamm DSM13 und dem Subtilisinproduktionsstamm P300**

### **4.2.1 Isolierung und Sequenzanalyse des *prsA* - Gens aus dem *B.licheniformis* Wildtypstamm DSM13**

Das PrsA - Protein von *B.subtilis* ist sehr wahrscheinlich als extracytoplasmatisches Chaperon an der korrekten Faltung exportierter Proteine beteiligt (Jacobs et al., 1993). Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob das Genprodukt des bisher nur bei *B.subtilis* identifizierten *prsA* - Gens eine Spezialisierung im Proteinexport von *B.subtilis* ist oder als wichtige Exportkomponente in Gram - positiven Bakterien weiter verbreitet ist, wurden Experimente zur Identifizierung und Isolierung eines *prsA* - homologen Gens von *B.licheniformis* durchgeführt. Mit Hilfe des *prsA* - Gens aus *B.subtilis* als Sonde konnte über DNA - DNA - Hybridisierung ein *prsA* - Homologes aus dem *B.licheniformis* Wildtypstamm DSM13 isoliert werden.

Wie bereits für das *B.subtilis prsA* - Gen beschrieben (Kontinen et al., 1991), wurde in dem 5' - nicht - kodierenden Bereich vor dem *B.licheniformis prsA* - Strukturgen die -10 Region eines potentiellen Promotors und in der 3' - nicht - kodierenden Region ein potentieller rho - unabhängiger Terminator identifiziert. Eine potentielle -35 - Region der Sequenz ATGATA konnte sowohl in einem Abstand von 20 Bp, als auch in einer Position überlappend, 15 Bp vor der -10 Region des *B.licheniformis prsA* - Gens identifiziert werden. Eine identische potentielle -35 Region (ATGATA) befindet sich 11 Nukleotide vor der -10 Region des *B.subtilis* - *prsA* - Gens. Obwohl diese Sequenz nur in zwei Positionen von der Konsensussequenz der -35 Region eines vegetativen *B.subtilis* Promotors (Moran et al., 1982) abweicht, wurde diese von Kontinen et al. (1991) wahrscheinlich nur deswegen nicht als mögliche Promotorregion des *B.subtilis prsA* - Gens angegeben, weil der Abstand von nur 11 Bp erheblich von dem für vegetative *B.subtilis* Promotoren angegebenen optimalen Abstand von 17 bis 18 Bp abweicht. Bei *B.licheniformis* stellt die identische Sequenz jedoch sehr wahrscheinlich die -35 Region des

*prsA* - Gens dar, da die Position dieser Sequenz nur um zwei bzw. drei Nukleotide vom optimalen Abstand abweicht.

Eine potentielle Ribosomenbindungsstelle, welche in fünf Positionen der von Farwell et al. (1992) für *B.subtilis* angegebenen starken Shine - Dalgarno - Sequenz entspricht, befindet sich neun Nukleotide vor dem ATG - Startkodon des *B.licheniformis prsA* - Gens. Diese, in einem für *B.subtilis* optimalen Abstand von 9 Nukleotiden vor dem Startkodon gelegene (Vellanoweth u. Rabinowitz, 1992) potentielle Ribosomenbindungsstelle stimmt genau mit der vor dem *B.subtilis prsA* - Gen identifizierten Shine - Dalgarno - Sequenz überein (Kontinen et al., 1991).

Das *B.subtilis prsA* - Gen liegt etwa 1800 Bp stromabwärts des in derselben Richtung transkribierten *hpr* - Gens, welches für einen die Expression exportierter Proteasen beeinflussenden globalen Regulator kodiert. Das *B.subtilis hpr* - Gen ist jedoch sehr wahrscheinlich nicht mit dem *B.subtilis prsA* - Gen in einem gemeinsamen Operon organisiert, da keine offenen Leserahmen signifikanter Länge zwischen diesen Genen liegen, und zusätzlich etwa 480 Bp vor dem *prsA* - Gen ein potentieller rho - unabhängiger Terminator identifiziert werden kann. Die Identifizierung eines potentiellen Promotors und Terminators in den angrenzenden nicht - kodierenden Bereichen des *B.licheniformis prsA* - Gens weisen darauf hin, daß das *B.licheniformis prsA* - Gen, wie das aus *B.subtilis* stammende *prsA* - Gen, sehr wahrscheinlich nicht in einem Operon organisiert ist.

#### **4.2.2 Analyse der Aminosäuresequenz des *B.licheniformis* PrsA - Proteins und Vergleich mit dem *B.subtilis* PrsA**

Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt, daß das PrsA - Protein von *B.licheniformis*, analog dem *B.subtilis* PrsA - Protein, wahrscheinlich als Vorläuferprotein mit einem für Lipoproteine charakteristischen Signalpeptid synthetisiert wird, und nach der Prozessierung als 32 kDa großes, extracytoplasmatisches Lipoprotein mit der *B.licheniformis* Zellwand assoziiert ist. Das *B.licheniformis* PrsA - Protein weist 69% identische Aminosäuren mit dem *B.subtilis* PrsA auf. Werden die Austausche von Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften berücksichtigt, dann beträgt die Sequenzhomologie sogar 79%. Aufgrund dieser großen Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenzen kann man davon ausgehen, daß es sich bei dem aus *B.licheniformis* isolierten Gen tatsächlich um das *prsA* - homologe Gen von *B.licheniformis* handelt und beide PrsA - Proteine in dem jeweiligen Organismus eine ähnliche Funktionen ausüben. Auffällig ist, daß die zentralen Bereiche der PrsA - Proteine (Aminosäure 147 bis Aminosäure 173) über eine Länge von 27 Aminosäuren absolut identisch sind. Im Gegensatz dazu sind der Amino- und der Carboxyterminus der reifen PrsA - Proteine weniger stark konserviert. Dies läßt vermuten, daß der zentrale, stark konservierte Proteinbereich eine für die PrsA - Funktion essentielle Domäne darstellt. Diese Domäne könnte eine wichtige Rolle

bei der Wechselwirkung des PrsA - Proteins mit sekretorischen Proteinen spielen oder an der Wechselwirkung von PrsA mit anderen Zellwandbestandteilen beteiligt sein.

#### **4.2.3 Isolierung des *prsA* - Gens aus dem *B.licheniformis* - Produktionsstamm P300 und Vergleich der Sequenz mit dem *prsA* - Gen von dem *B.licheniformis* Wildtyp DSM13**

Der *B.licheniformis* Stamm P300 ist ein industriell genutzter Subtilisinproduzent, der die alkalische Protease (Subtilisin) im Vergleich zu dem Wildtyp DSM13 stark überproduziert. Einer der Gründe für diese Überproduktion liegt in einer zu einer verstärkten Subtilisinsynthese führenden Promotor - Mutation (persönliche Mitteilung Henkel KGaA). Da dieser Produktionsstamm jedoch durch mehrfache Zyklen von Mutagenese und Screening isoliert wurde, müssen neben dieser Promotormutation noch weitere, die Subtilisinproduktion steigernde Mutationen vorliegen. Es wäre denkbar, daß eine derartige Mutation im *prsA* - Gen des *B.licheniformis* Stammes P300 zu finden ist: In der Cytoplasmamembran einer *B.subtilis* *prsA* - Mutante (*prsA* - 3) ist eine gegenüber der Wildtyp - Membran verringerte PrsA - Proteinmenge nachweisbar (Jacobs et al., 1993). Weiterhin ist in dieser Mutante unter  $\alpha$  - Amylase - Überproduktionsbedingungen eine deutliche Verschlechterung der Proteinsekretion zu beobachten (Kontinen u. Sarvas, 1988). Möglicherweise wird in dieser Mutante das in geringerer Menge vorhandene PrsA durch die Wechselwirkung mit den sekretorischen Proteinen austitriert, so daß ein großer Anteil der Exportproteine nicht korrekt gefaltet und somit verstärkt im Überstand proteolytisch abgebaut wird (Jacobs et al., 1993). Das PrsA - Protein scheint daher vor allem unter Überproduktionsbedingungen an der effektiven Sekretion von Proteinen beteiligt zu sein. Um zu klären, ob in dem *B.licheniformis* - Stamm P300 eine das *prsA* - Gen betreffende Mutation vorliegt, die möglicherweise die Expression des PrsA - Proteins oder dessen Wechselwirkung mit Exportproteinen beeinflusst, wurde das *prsA* - Gen des Stammes P300 mit den flankierenden nicht - kodierenden Bereichen mittels PCR aus der chromosomalen P300 - DNA isoliert und sequenziert. Der Sequenzvergleich des aus dem *B.licheniformis* Wildtypstamm DSM13 isolierten *prsA* - Gens mit dem aus dem Produktionsstamm P300 stammenden Gens zeigte jedoch, daß der Subtilisinproduzent weder eine Mutation im *prsA* - Strukturgen, noch in den angrenzenden nicht - kodierenden Bereichen aufweist. Es ist dennoch nicht auszuschließen, daß in dem *B.licheniformis* Stamm P300 trotzdem eine das *prsA* - Gen betreffende Mutation vorliegt, die außerhalb des in dieser Arbeit sequenzierten DNA - Bereiches liegt. Die in den *B.subtilis* *prsA* - Mutanten *prs* - 29 und *prs* - 40 gefundenen Mutationen liegen auch tatsächlich ca. 300 Nukleotide vor dem für das PrsA - Protein kodierenden Leserahmen. Dennoch beeinträchtigen diese beiden Mutationen die Faltung und Stabilität der in *B.subtilis* sekretierten Proteine ebenso wie die im *B.subtilis* *prsA* - Strukturgen identifizierte Mutation *prsA* - 3 (Kontinen u. Sarvas, 1988; Kontinen et al., 1991). Da die Analyse der Sequenzdaten des *B.subtilis* *prsA* - Gens zeigte, daß das *prsA* - Gen sehr wahrscheinlich nicht in einem

Operon organisiert ist (Kontinen et al., 1991), kann ein polarer Effekt der Mutationen *prs* - 29 und - 40 auf die Transkription des *prsA* - Gens eigentlich ausgeschlossen werden. Es gibt z.Z. noch keinen Hinweis darauf, auf welche Weise diese Mutationen die PrsA - Funktionen beeinträchtigen. Es ist daher nicht völlig auszuschließen, daß stromaufwärts der 113 sequenzierten Nukleotide des 5' nicht - kodierenden Bereiches eine Mutation liegen könnte, die die Expression des PrsA - Proteins im Subtilisinüberproduzenten P300 beeinflußt und somit zu der gegenüber dem Wildtyp erhöhten Subtilisinproduktivität beiträgt.

## 5. Zusammenfassung

Um bei der biotechnologischen Produktion extrazellulärer Proteine eine möglichst große Ausbeute zu erzielen, werden diese Proteine stark überexprimiert. Die intrazelluläre Überproduktion kann jedoch sowohl in Gram - negativen als auch in Gram - positiven Bakterien zu einer Überlastung der zellulären Sekretionskapazität und somit zu der Akkumulation von Vorläufern im Cytoplasma führen, wodurch die Ausbeute an sekretiertem Protein vermindert wird. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Sekretionskapazität in Gram - negativen bzw. in Gram - positiven Bakterien unter Überproduktionsbedingungen durch die erhöhte zelluläre Konzentration des exportspezifischen Chaperons SecB bzw. der zentralen Exportkomponente SecA gesteigert werden kann.

Die zelluläre Konzentration der Exportkomponente SecA wurde sowohl in *Escherichia coli*, als auch in *Bacillus subtilis* durch die Einführung zusätzlicher *secA* - Genkopien erhöht. Das homologe SecB -Protein wurde in *E.coli* ebenfalls überexprimiert, während in *B.subtilis* das heterologe *E.coli* - SecB - Protein exprimiert wurde, da bisher kein SecB - Homologes in Gram - positiven Bakterien identifiziert werden konnte. Mit Hilfe SecB - spezifischer Antikörper wurde nachgewiesen, daß das *E.coli* - SecB in *B.subtilis* als stabiles Protein gebildet wurde. Die Untersuchungen zum Export von Signalsequenzmutanten des *E.coli* Außenmembranproteins OmpA bzw. der Lipase von *Staphylococcus hyicus* zeigten, daß der Proteinexport in *E.coli* und *B.subtilis* weder durch die Erhöhung des SecA - Proteins noch des SecB - Proteins gesteigert werden konnte. Vermutlich wird die Sekretionskapazität in Gram - negativen und Gram - positiven Bakterien durch die Zahl der in der Cytoplasmamembran lokalisierten Translokatoren begrenzt.

Um einen Hinweis auf die Verbreitung des bisher nur aus *B.subtilis* bekannten PrsA - Proteins in Gram - positiven Bakterien zu erhalten, wurde ein *prsA* - homologes Gen aus *Bacillus licheniformis* isoliert. Das PrsA - Protein von *B.subtilis* ist ein 32 kDa großes Lipoprotein, welches sehr wahrscheinlich als extracytoplasmatisches Chaperon an der korrekten Faltung exportierter Proteine und an der effektiven Sekretion von Exoproteinen in *B.subtilis* beteiligt ist. Mittels einer Sonde des *B.subtilis* - *prsA* - Gens wurde das *prsA* - homologe Gen aus dem *B.licheniformis* - Wildtypstamm DSM13 isoliert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des isolierten Gens zeigt, daß es sich bei dem Genprodukt, in Übereinstimmung mit dem *B.subtilis* PrsA - Protein, um ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa handelt, welches zu 69% identische Aminosäuren mit dem *B.subtilis* - PrsA - Protein besitzt. Analog zum *B.subtilis* *prsA* - Gen ist das *B.licheniformis* *prsA* - Gen sehr wahrscheinlich nicht in einem Operon organisiert, da sowohl ein potentieller Promotor wie auch ein Terminator in den angrenzenden nicht - kodierenden Bereichen identifiziert werden konnten. Die Isolierung eines *prsA* - homologen Gens aus *B.licheniformis* zeigt, daß das PrsA - Protein offensichtlich keine Spezialisierung im Proteinexport bei *B.subtilis* darstellt, sondern daß PrsA- homologe Proteine in weiteren Gram - positiven Bakterien vorhanden sind.

## 6. Literatur

- Akita, M., Shinkai, A., Matsuyama, S.-I., Mizushima, S.** (1991): SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. Biochem. Biophys. Res. Commun. **174**: 211 - 216
- Akiyama, Y., Ito, K.** (1987): Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. EMBO J. **6**: 3465 - 3470
- Altman, E., Emr, S.D., Kumamoto, C. A.** (1990): The presence of both the signal sequence and the region of mature LamB protein is required for the interaction of LamB with the export factor SecB. J. Biol. Chem. **265**: 18154 - 18160
- Bachmann, B. J.** (1990): Linkage map of *Escherichia coli* K - 12, Edition 8, Microbiol. Rev. **54**: 130 - 197
- Bensadoun, A., Weinstein, D.** (1976): Assay of proteins in the presence of interfering material. Anal. Biochem. **70**: 241 - 250
- Bieker, K., Silhavy, T.J.** (1990): PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein secretion in *Escherichia coli*. Cell **61**: 833 - 842
- Birnboim, C., Doly, J.** (1979): Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **9**: 2989 - 2998
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S.** (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. Gene **2**: 95 - 113
- Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Wickner, W.** (1990): The purified *Escherichia coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA - dependent precursor protein translocation. Cell **62**: 649 - 657
- Brundage, L., Fimmel, C.J., Mizushima, S., Wickner, W.** (1992): SecY, SecE and Band1 form the membrane - embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. J. Biol. Chem. **267**: 4166 - 4170

**Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** (1987): XL1 - Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta - galactosidase selection. Bio Techniques 5 (4): 376 - 378

**Byström, A.S., Hjalmarsson, K.J., Wikström, P.M., Björk, G.R.** (1983): The nucleotide sequence of an *Escherichia coli* operon containing genes for the tRNA (m<sup>1</sup>G) methyltransferase, the ribosomal proteins S16 and L19 and a 21- K polypeptide. EMBO J. 2:899 - 905

**Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Qian, L., Oliver, D.B.** (1991): Characterization of membrane - associated and soluble states of SecA protein from wild - type and SecA51(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266: 24420 - 24427

**Caruthers, M.H., Barone, A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteucci, M., Stabinsky, Z., Tang, J.-Y.** (1987): Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the Phosphoramid Method. Meth. in Enzymol. 154: 287 - 313

**Clark, D., Lightner, V., Edgar, R., Modrich, P., Cronan, J.E., Bell, R.M.** (1980): Regulation of phospholipid biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255: 714 - 717

**Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L.** (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 - 2114

**Collier, D.N., Bankaitis, B.A., Weiss, J.B., Bassford, P.J.** (1988): The antifolding activity of SecB promotes the export of the *Escherichia coli* maltose - binding protein. Cell 53: 273 - 283

**Collier, D.N.** (1994): *Escherichia coli* signal peptides direct inefficient secretion of an outer membrane protein (OmpA) and periplasmic proteins (maltose - binding protein, ribose - binding protein, and alkaline phosphatase) in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176 (10): 3013 - 3020

**Cunningham, K., Wickner, W.** (1989): Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8630 - 8634

**Dalbey, R.E., Wickner, W.** (1987): Leader peptidase of *Escherichia coli*: critical role of a small domain in membrane assembly. Science 235: 783 - 787

- de Cock, H., Tommassen, J.** (1991): Conservation of components of the *Escherichia coli* export machinery in prokaryotes. FEMS Microbiol. Letters **80**: 195 - 200
- Downing, W.L., Sullivan, S.L., Gottesman, M.E., Dennis, P.P.** (1990): Sequence and transcriptional pattern of the essential *Escherichia coli* *secE* - *msG* operon. J. Bacteriol. **172**: 6121 - 6127
- Driessen, A.J.M.** (1993): SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is functional as a dimer. Biochemistry **32**: 13190 - 13197
- Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R.** (1971): Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. **56**: 209 - 221
- Ellis, J.R., Hemmingsen, S.M.** (1989): Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolar structures. TIBS **14**: 339 - 342
- Emr, S.D., Bassford, P. J.** (1982): Localization and processing of outer membrane and periplasmic proteins in *Escherichia coli* strains harboring export - specific suppressor mutations. J. Biol. Chem. **257**: 5852 - 5860
- Englesberg, E., Irr, J., Power, J., Lee, N.** (1965): Positive control of enzyme synthesis by *geneC* in the L - arabinose system. J. Bacteriol. **90**: 946 - 957
- Farwell, M.A., Roberts, M.W., Rabinowitz, J.C.** (1992): The effect of ribosomal protein S1 from *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* on protein synthesis *in vitro* by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **6** (22): 3375 - 3383
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C.** (1989) The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J. Bacteriol. **171**: 1379 - 1385
- Freudl, R., MacIntyre, S., Degen, M., Henning, U.** (1988): Alterations of the signal peptide of an outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K - 12 can promote either the cotranslational or the posttranslational mode of processing. J. Biol. Chem. **263** (1): 344 - 349
- Freudl, R.** (1992): Protein secretion in Gram - positive bacteria. J. Biotechnol. **23**: 231 - 240



- Frings, E.** (1990): Untersuchung des Proteinexports bei Gram - positiven Bakterien am Beispiel der Lipase von *Staphylococcus hyicus*. Diplomarbeit, RWTH Aachen
- Gannon, P.M., Li, P., Kumamoto, C.A.** (1989): The mature protein of *Escherichia coli* maltose binding protein (MBP) determines the dependence of MBP on SecB for export. J. Bacteriol. **171**: 813 - 818
- Gardel, C., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S., Beckwith, J.** (1987): *SecD*, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**: 1286 - 1290
- Gardel, C., Lohanson, K., Jaq, A., Beckwith, J.** (1990): The *secD* locus of *Escherichia coli* codes for two membrane proteins required for protein export. EMBO J. **9**: 3209 - 3216
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J., Robson, B.** (1978): Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. J. Mol. Biol. **120**: 97 - 120
- Gebert, J.F., Overhoff, B., Manson, M.D., Boos, W.** (1988): The *tsr* chemosensory transducer of *Escherichia coli* assembles into cytoplasmic membrane via a SecA - dependent process. J. Biol. Chem. **263**: 16652 - 16660
- Gill, D.R., Hatfull, G.F., Salmond, G.P.C.** (1986): A new cell division operon in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **205**: 134 - 145
- Götz, F., Popp, F., Korn, E., Schleifer, K.H.** (1985): Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. Nucleic Acids Res. **13**: 3895 - 3906
- Greenblatt, J., Schleif, R.** (1971): Arabinose C protein: regulation of the arabinose operon *in vitro*. Nature (London) New Biol. **233**: 166- 170
- Haandrikman, A.J., Meesters, R., Laan, H., Konings, W.N., Kok, J., Venema, G.** (1991): Processing of the *lactococcal* extracellular serine proteinase. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1899 - 1904
- Hardy, K.G.** (1985): Bacillus cloning methods, Glover, D.M. (ed.), DNA cloning Vol.II, 1 - 17, IRL Press, Oxford, Washington D.C.

- Hartl, F.-U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., Wickner, W.** (1990): The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *Escherichia coli* plasma membrane. *Cell* **63**: 269 - 279
- Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J.** (1982): A dot - immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* **119**: 142 - 147
- Hayashi, S. und Wu, H., C.** (1989): Posttranslational modifications and processing of *Escherichia coli* pro - lipoprotein *in vitro* using inverted membrane vesicles from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1989 American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 249
- Hayashi, S. und Wu, H., C.** (1990): Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22** (3): 451 - 471
- Hengge - Aronis, R.** (1990): persönliche Mitteilung, Universität Konstanz
- Honda, K., Nakamura, K., Nishiguchi, M., Yamane, K.** (1993): Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *J. Bacteriol.* **175** (15): 4885 - 4894
- Huynh, T.V., Young, R.A., Davis, R.W.** (1985) in *DNA Cloning*, Volume 1, Glover, D.M (ed.), 56 - 110, IRL Press Limited:Oxford, England
- Ichihara, S., Suzuki, T., Suzuki, M., Mizushima, S.** (1986): Molecular cloning and sequencing of the *sppA* gene and characterization of the encoded protease IV, a signal peptide peptidase, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 9405 - 9411
- Ikemura, H., Takagi, H., Innouye, M.** (1987): Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 204 - 208
- Innis, M.A., Tokunaga, M., Williams, M.E., Loranger, J.M., Chang, S.Y., Wu, H.C.** (1984): Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (*lsp*) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3708 - 3712
- Ish - Horowitz, D., Burke, J.F.** (1981): Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989 - 2998

- Ito, K.** (1992): SecY and integral membrane components of the *Escherichia coli* protein translocation system. *Mol. Microbiol.* **6**: 2243 - 2253
- Jacobs, M., Andersen, J.B., Kontinen, V., Sarvas, M.** (1993): *Bacillus subtilis* PrsA is required *in vivo* as an extracytoplasmatic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without prosequences. *Mol. Microbiol.* **8** (5): 957 - 966
- Jeong, S., Yoshikawa, H., Takahashi, H.** (1993): Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10** (1): 133 - 142
- Joly, J.C., Wickner, W.** (1993): The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.* **12**: 255 - 263
- Kaiser, K., Murray, N.E.** (1979): Physical characterization of the "Rac prophage" in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **175**: 159 - 174
- Kawamura, F., Doi, R.H.** (1984): Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**: 442 - 444
- Klose, M., Schimz, K.-L., van der Wolk, J., Driessen, A.J. M., Freudl, R.** (1993): Lysine-106 of the putative catalytic ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* SecA protein is required for the functional complementation of *Escherichia coli* *secA* mutants *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **268**: 4504 - 4510
- Kontinen, V.P., Sarvas, M.** (1988): Mutants of *Bacillus subtilis* defective in protein export. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2333 - 2344
- Kontinen, V.P., Saris, P., Sarvas, M.** (1991): A gene (*prsA*) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. *Mol. Microbiol.* **5** (5): 1273 - 1283
- Kumamoto, C., Beckwith, J.** (1985): Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **163**: 267 - 274
- Kumamoto, C., Nault, A.K.** (1989): Characterization of the *Escherichia coli* protein - export gene *secB*. *Gene* **75**: 167 - 175
- Kumamoto, C.** (1991): Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol. Microbiol.* **5** (1): 19 - 22

**Kusters, R., de Vrije, T., Breukink, E., de Kruijff, B.** (1989): SecB protein stabilizes a translocation-competent state of purified prePhoE protein. *J. Biol. Chem.* **264**: 20827 - 20830

**Kusters, R., Dowhan, W., de Kruijff, B.** (1991): Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**: 8659 - 8662

**Lämmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 - 685

**Lamiet, A., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., Plückthun, A.** (1990): The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of  $\beta$ -lactamase precursor. *EMBO J.* **9**: 2315 - 2319

**Lathigra, R.B., Young, D.B., Sweetser, D., Young, R.A.** (1988): A gene from *Mycobacterium tuberculosis* which is homologous to the DnaJ heat shock protein of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7545 - 7562

**Lecker, S., Lill, R., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., Bassford, P., Kumamoto, C., Wickner, W.** (1989): Three pure chaperones of *Escherichia coli* - SecB, trigger factor and GroEL - form soluble complexes with precursor proteins *in vitro*. *EMBO J.* **9**: 2703 - 2709

**Le Grice, S.F.J., Gentz, R., Peschke, U., Stuber, D., Beuck, V., Bujard, H.** (1986): Intergenic utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals, In: *Bacillus molecular genetics and biotechnology applications*. Academic Press, Inc.: 433 - 445

**LeGrice, S.F.J.** (1990): Regulated promoter for high-level expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*. *Meth. Enzymol.* **185**: 201 - 214

**Li, M., Wong, S.-L.** (1992): Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 3981 - 3992

**Liebke, H.H.** (1987): Multiple SecA isoforms in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169** (3): 1174 - 1181

**Liebl, W.** (1986): Expression fusionierter Gene und Sekretion ihrer Produkte in *Staphylokokken*. Dissertation TU München

**Lill, R., Dowhan, W., Wickner, W.** (1990): The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY and the leader domains of precursor proteins. *Cell* **60**: 271 - 280

**MacIntyre, S., Mutschler, B., Henning, U.** (1991): Requirement of the SecB chaperone for export of a non-secretory polypeptide in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 224 - 228

**Marco, S., Yalpueta, J.M., Rivas, G., Andres, G., San Martin, C., Carrascosa, J.L.** (1993): A structural model for the GroEL chaperonin. *FEMS Microbiol. Letters* **106**: 301 - 308

**Matsuyama, S., Akimaru, J., Mizushima, S.** (1990): SecE - dependent overproduction of SecY in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **269**: 96 - 100

**Matsuyama, S., Fujita, Y., Mizushima, S.** (1993): SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 265 - 270

**McFarland, L., Francetic, O., Kumamoto, C.** (1993): A mutation of *Escherichia coli* SecA protein that partially compensates for the absence of SecB. *J. Bacteriol.* **175** (8): 2255 - 2262

**Meens, J., Frings, E., Klose, M., Freudl, R.** (1993): An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **9** (4): 847 - 855

**Meens, J., Klose, M., Freudl, R.** (1994): The *Staphylococcus carnosus* *secE* gene: cloning, nucleotide sequence, and functional characterization in *Escherichia coli* *secE* mutant strains. *FEMS Microbiol. Letters* **117**: 113 - 120

**Miller, J.H.** (1972): Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

**Moran, C.P., Lang, N., Le Grice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A.L., Pero, J., Losick, R.** (1982): Nucleotide sequence that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 339 - 346

**Morona, R., Klose, M., Henning, U.** (1984): *Escherichia coli* outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *J. Bacteriol.* **159**: 570 - 578

- Nakamura, K., Nakamura, A., Takamatsu, H., Yoshikawa, H., Yamane, K.** (1990 a): Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene homologous to *Escherichia coli* *secY*. J. Biochem. **107**: 603 - 607
- Nakamura, K., Takamatsu, H., Akiyama, J., Ito, K., Yamane, K.** (1990 b): Complementation of the protein transport defect of an *Escherichia coli* *secY* mutant (*secY24*) by *Bacillus subtilis* *secY* homologue. FEBS Letters **273**: 75 - 78
- Nakamura, K., Imai, Y., Nakamura, A., Yamane, K.** (1992): Small cytoplasmic RNA of *Bacillus subtilis*: functional relationship with human signal recognition particle 7S RNA and *Escherichia coli* 4.5S RNA. J. Bacteriol. **174**: 2185 - 2192
- Narberhaus, F., Giebler, K., Bahl, H.** (1992): Molecular characterization of the *dnaK* gene region of *Clostridium acetobutylicum* including *gpe*, *dnaJ*, and a new heat shock gene. J. Bacteriol. **174**: 3290 - 3299
- Nilsson, I., Gafvelin, G., von Heijne, G.** (1993): Different *sec* - requirements for signal peptide cleavage and protein translocation in a model *Escherichia coli* protein. FEBS **318** (1): 7 - 10
- Nishiyama, K., Mizushima, S., Tokuda, H.** (1993): A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. **12** (9): 3409 - 3415
- Novak, P., Ray, P.H., Dev, I.K.** (1986): Localization and purification of two enzymes from *Escherichia coli* capable of hydrolyzing a signal peptide. J. Biol. Chem. **261**: 420 - 427
- Oliver, D.B., Beckwith, J.** (1982): Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. Cell **30**: 311 - 319
- Overhoff, B., Klein, M., Spies, M., Freudl, R.** (1991): Identification of a gene fragment which codes for the 364 - aminoterminal amino acid residues of a SecA homologue from *Bacillus subtilis*: further evidence for the conservation of the protein export apparatus in gram - positive and gram - negative bacteria. Mol. Gen. Genet. **228**: 417 - 423
- Perez-Perez, J., Marquez, G., Barbero, J.-L., Gutierrez, J.** (1994): Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. Bio/Technol. **12**: 178 - 180

**Phillips, G.J., Silhavy, T.J.** (1992): The *Escherichia coli* *ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature* **359**: 744 - 746

**Piggot, P.J., Amjad, M., Wu, J.J., Sandval, H., Castro, J.** (1990): Genetic and physical maps of *Bacillus subtilis* 168. In: Harwood, C.R. , Cutting, S.M. (ed.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, Chichester

**Pogliano, J.A., Beckwith, J.** (1994): SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13** (3), 554 - 561

**Popp, F.** (1986): Molekularbiologische Charakterisierung des Lipasegens aus *Staphylococcus hyicus* kloniert in *Staphylococcus carnosus*. Dissertation TU München

**Poritz, M.A., Strub, K., Walter, P.** (1988): Human SRP RNA and *Escherichia coli* 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain. *Cell* **55**: 4 - 6

**Poritz, M.A., Bernstein, H.D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H., Walter, P.** (1990): An *Escherichia coli* ribonucleoprotein particle containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* **250**: 1111 - 1117

**Power, S.D., Adams, R.M., Wells, J.A.** (1986): Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3096 - 3100

**Priest, F.G.** (1977): Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711 - 753

**Priest, F.G.** (1989): Products and applications. In: *Biotechnology Handbooks 2 Bacillus* (Harwood, C.R., ed.) , Plenum London: 293 - 320

**Pugsley, A.P.** (1989): Protein targeting. Academic Press, San Diego, Calif.

**Rescei, P.A., Gruss, A.D., Novick, R.P.** (1987): Cloning, sequence and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1127 - 1131

**Rollo, E.E., Oliver, D.B.** (1988): Regulation of the *Escherichia coli* *secA* gene by protein secretion defects: Analysis of *secA*, *secB*, *secD*, *secY* mutants. *J. Bacteriol.* **170**: 3281 - 3282

- Rygus, T., Hillen W.** (1991): Inducible high - level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose - utilization operon. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**: 594 - 599
- Sadaï, Y., Kada, T.** (1985): *Bacillus subtilis* gene involved in cell division, sporulation and exoenzyme secretion. J. Bacteriol. **163**: 648 - 654
- Sadaie, Y., Takamatsu, H., Nakamura, K., Yamane, K.** (1991): Sequencing reveals similarity of the wild - type *div*<sup>+</sup> gene of *Bacillus subtilis* to the *Escherichia coli secA* gene. Gene **98**: 101 - 105
- Saiki, R.K., Gefland, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuoki, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, M.A.** (1988): Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymere. Science **239**: 487 - 491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F.G., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 5463 - 5467
- San Millan, J.L., Boyd, D., Dalbey, R., Wickner, W., Beckwith, J.** (1989): Use of *phoA* fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase. J. Bacteriol. **171**: 5536 - 5541
- Sarvas, M.** (1986): Protein secretion in *Bacilli*. Curr. Topics Microbiol. Immunol. **125**: 103 - 126
- Schatz, P.J., Bieker, K.L., Ottemann, K.M., Silhavy, T.J., Beckwith, J.** (1991): One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *Escherichia coli* secretory machinery. EMBO J. **10**: 1749 - 1757
- Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U., Wickner, W.** (1991): Delta  $\mu$ H and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. Cell **64**: 927 - 939
- Schlegel, H.G.** (1985): Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart - New York
- Schleifer, K.H., Fischer, U.** (1982): Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. Int. J. Syst. Bacteriol. **32**: 153 - 156



- Schmidt, A., Schiesswohl, U., Völker, U., Hecker, M., Schumann, W.** (1992): Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **174**: 3993 - 3999
- Schmidt, M.G., Rollo, E.E., Grodberg, J., Oliver, D.B.** (1988): Nucleotide sequence of the *secA* gene and *secA* (*Ts*) mutations preventing protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**: 3404 - 3414
- Schmidt, M.G., Oliver, D.B.** (1989): SecA protein autogenously represses its own translation during normal protein secretion in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171**: 643 - 649
- Schmidt, M.G., Dolan, K.M., Oliver, D.B.** (1991): Regulation of *Escherichia coli secA* mRNA translation by a secretion - responsive element. J. Bacteriol. **173** (20): 6605 - 6611
- Shine, J., Dalgarno, L.** (1974): The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA is complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**: 1342 - 1346
- Sibakov, V., Lehtovaara, P., Pettersson, R., Lundstrom, K., Karkkinen, N., Ulmanen, I., Takkinen, K., Kaariainen, L., Palva, I.** (1984): Secretion of foreign gene products by the aid of a *bacillus* secretion vector. In: Genetics and Biotechnology of Bacilli (Ganesan, A.T. and Hoch, J.A., eds.), Academic Press, Orlando: 153 - 162
- Silhary, T.J., Berman, M.L., Enquist, L.W.** (1984): Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory: New York.
- Simon, S.M., Blobel, G.** (1992): Signal peptides open protein - conducting channels in *Escherichia coli*. Cell **69**: 677 - 684
- Simonen, M., Palva, I.** (1993): Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. **57** (1): 109 - 137
- Smith, N.R., Gibson, T., Gordon, R.E., Sneath, P.H.A.** (1964): Type cultures and proposed neotype cultures of some species in the genus *Bacillus*. J. Gen. Microbiol. **34**: 269 - 272
- Southern, E.M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA - fragments separated by gel electrophoreses. J. Mol. Biol. **98**: 503 - 517

- Stader, J., Gansheroff, L.J., Silhavy, T.J.** (1989): New suppressors of signal - sequence mutations, *prlG*, are linked tightly to the *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3**: 1045 - 1052
- Suh, J.W., Boylan, S.A., Thomas, S.M., Dolan, K.M., Oliver, D.B., Pice, C.W.** (1990): Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Mol. Microbiol.* **4**: 305 - 314
- Takamatsu, H., Fuma, S., Nakamura, K., Sadaie, Y., Shinkai, A., Matsuyama, S., Mizushima, S., Yamane, K.** (1992): *In vivo* and *in vitro* characterization of the *secA* gene product of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174** (13): 4308 - 4316
- Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Mosahashi, W., Hashimoto-Gotoh, T.** (1987): High - copy - number and low - copy - number plasmid vectors for lacZ  $\alpha$  - complementation and chloramphenicol or kanamycin - resistance selection. *Gene* **61**: 63 - 74
- Towbin, H.G., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350 - 4354
- Ullbrandt, N.D., London, E., Oliver, D.B.** (1992): Deep penetration of a portion of *Escherichia coli* SecA protein into model membranes is promoted by anionic phospholipids and by partial unfolding. *J. Biol. Chem.* **267**: 15184 - 15192
- Ulmann, I., Lundström, P., Lehtovaara, M., Sarvas, M., Ruohonen, M., Palva, I.** (1985): Transcription and translation of foreign genes in *Bacillus subtilis* by the aid of a secretion vector. *J. Bacteriol.* **162**: 176 - 182
- van der Wolk, J., Klose, M., Breukink, E., Demel, R.A., de Kruijff, B., Freudl, R., Driessen, A.J.M.** (1993): Characterization of a *Bacillus subtilis* SecA mutant protein deficient in translocation ATPase and release from the membrane. *Mol. Microbiol.* **8**: 31 - 42
- van Dijk, J.M., de Jong, A., Vehmaanperä, G., Venema, G.** (1992): Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J.* **11**: 2819 - 2828
- Vellanoweth, R. L.; Rabinowitz, (1992):** The influence of ribosome - binding - site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* *in vivo*. *J. Mol. Microbiol.* **6** (9): 1105 - 1114

**Vogel, H.J., Bonner, D.M.** (1956): Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J. Biol. Chem. **218**: 97 - 106

**von Heijne, G.** (1983): Patterns of amino acids near signal - sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem. **133**: 17 - 21

**von Heijne, G.** (1985): Signal sequences. The limits of variation. J. Mol. Biol. **184**: 99 - 105

**von Heijne, G.** (1989): The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. Prot. Eng. **2**: 531 - 534

**von Heijne, G.** (1990): The signal peptide. J. Memb. Biol. **115**: 195 - 201

**von Heijne, G., Abrahmsen, L.** (1989): Species - specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. FEBS Letters **244**: 439 - 446

**Vos, P., van Asseldonk, M., van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G., de Vos, W.M.** (1989): A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine protease located in or secreted from the cell envelope. J. Bacteriol. **171**(5): 2795 - 2802

**Watanabe, M., Blobel, G.** (1989): Cytosolic factor purified from *Escherichia coli* is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 2728 - 2723

**Weiss, J.B., Ray, P.H., Bassford, Jr., P.J.** (1988): Purified SecB protein of *Escherichia coli* retards folding and promotes translocation of the maltose - binding protein *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 8978 - 8982

**Wenzig, E., Lottspeich, F., Verheij, B., de Haas, G.H., Götz, F.** (1990): Extracellular processing of the *Staphylococcus hyicus* lipase. Biochem. (Life Sci. Adv.) **9**: 47 - 56

**Wetzstein, M., Völker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Hergert, C., Hecker, M., Schumann, W.** (1992): Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **174**: 3300 - 3310

**Wild, J., Altman, E., Yura, T., Gross, C.A.** (1992): DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. Genes Dev. **6**: 1165 - 1172

**Wong, S.L., Doi, R.H.** (1986): Determination of the signal sequence cleavage site in the preprosubtilisin of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **261**: 10176 - 10181

**Wu, H.C.** (1987): In: Bacterial outer membranes as model systems. (Inouye, M.,ed.). Wiley, New York: 37 - 71

**Yanish - Perron, C., Viera, J., Messing, J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**: 103 - 119

**Zhao, X., Wu, H.C.** (1992): Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* signal peptidase II (*lsp*) gene. FEBS Letters **299**: 80 - 84

## Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin -5'- triphosphat
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen - diamino - tetraacetic acid
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl - $\beta$ -D- thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo - Dalton
l	Liter
M	molar, Konzentrationsangabe
MCS	Multiple - Klonierungsstelle
min	Minute
mol	Mole, Mengenangabe
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase - Ketten - Reaktion
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium - Dodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N'N'N'N' - Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan
U	unit, Enzymeinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent

## Ein- und Drei - Buchstaben Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Professor Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas sowie seine Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. habil R. Freudl für seine Diskussionsbereitschaft und seine Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima, ihre Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft, insbesondere bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe: A. Bida, S. Crombach, G. Decker, M. Herbort, M. Klein, Dr. M. Klose, Dr. J. Meens, Dr. K.L. Schimz und Dr. S. Tschauder.

Bei Herrn Dr. M. Klose, Herrn Dr. K.L. Schimz und Herrn Dr. G. Sprenger bedanke ich mich weiterhin für die freundliche Überlassung von Antikörpern und Plasmiden.

Herrn S. Peters danke ich für die Ausführung der photographischen Arbeiten.







**Jül-3101**  
**Juli 1995**  
**ISSN 0944-2952**